

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Estudio del fraccionamiento de la lignocelulosa mediante
procesos con disolventes y los estudios para el análisis y
aprovechamiento de las fracciones**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Priscila Vergara Alarcón

Directores

Félix García-Ochoa Soria
Juan Carlos Villar Gutiérrez

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y MATERIALES



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DEL FRACCIONAMIENTO DE LA LIGNOCELULOSA MEDIANTE
PROCESOS CON DISOLVENTES Y LOS ESTUDIOS PARA EL ANÁLISIS Y
APROVECHAMIENTO DE LAS FRACCIONES**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN EL PROGRAMA DE
DOCTORADO EN INGENIERÍA QUÍMICA

PRESENTADA POR:

Priscilla Vergara Alarcón

BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS DOCTORES:

Félix García-Ochoa Soria
Juan Carlos Villar Gutiérrez

Madrid, 2019



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. PRISCILLA VERGARA ALARCÓN,
estudiante en el Programa de Doctorado INGENIERÍA QUÍMICA,
de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

ESTUDIO DEL FRACCIONAMIENTO DE LA LIGNOCELULOSA MEDIANTE PROCESOS CON
DISOLVENTES Y LOS ESTUDIOS PARA EL ANÁLISIS Y APROVECHAMIENTO DE LAS FRACCIONES

y dirigida por: _____
Dr. Félix García-Ochoa Soria
Dr. Juan Carlos Villar Gutiérrez

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 24 de junio de 2019

Fdo.: _____

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

El Dr. Félix García-Ochoa Soria, Profesor del Departamento de Ingeniería Química y Materiales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, y el Dr. Juan Carlos Villar Gutiérrez, Investigador del Centro de Investigación Forestal (CIFOR), perteneciente al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA),

Informan:

Que el trabajo de investigación recogido en la memoria titulada “Estudio del fraccionamiento de la lignocelulosa mediante procesos con disolventes y los estudios para el análisis y aprovechamiento de las fracciones” ha sido realizado, bajo su dirección, por Priscilla Vergara Alarcón, en los laboratorios de Celulosa y Papel del Centro de Investigación Forestal (CIFOR) perteneciente al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), y que reúne los requisitos de originalidad y rigor científico necesarios para optar al Grado de Doctor, autorizando su presentación en la Universidad Complutense de Madrid.

Los Directores,

Dr. Félix García-Ochoa Soria

Dr. Juan Carlos Villar Gutiérrez

*Esta Tesis está dedicada a mis padres,
Eduardo Vergara y María Alarcón,
Y a mis hermanos Octavio y Sebastián
por su amor, apoyo y motivación a lo largo de mi vida.*

“Aquellos de nosotros que nos hemos ido muchas veces, desarrollamos por necesidad un cuero duro. Como carecemos de raíces y de testigos del pasado, debemos confiar en la memoria para dar continuidad a nuestra vida, pero la memoria es siempre borrosa y no podemos fiarnos de ella”

(Isabel allende - Mi país inventado)

AGRADECIMIENTOS

La finalización de esta Tesis Doctoral representa el término de una de las etapas más importantes de lo que va de mi vida, tanto en mi formación profesional como en lo personal, que comenzó hace casi siete años, cuando tuve la oportunidad de venir a Madrid a realizar una estancia de investigación por seis meses, y que me abrió las puertas a esta aventura, no exenta de tropiezos, pero que sin lugar a dudas ha moldeado mi vida y ha hecho de mí esta persona de espíritu libre, independiente, incondicional, positiva, impulsiva, terca y a veces un poco dura...pero solo de fachada. Es por esto que quisiera agradecer con gran cariño a todas las personas que estuvieron junto a mí durante todos estos años y que de algún modo han hecho posible este trabajo, porque sin lugar a dudas todo esto no habría sido posible sin su compañía, comprensión, infinita paciencia y cariño.

En primer lugar quisiera agradecer a mis directores de Tesis, Dr. Félix García-Ochoa Soria y Dr. Juan Carlos Villar Gutiérrez, por haber confiado en mí y haberme dado la gran oportunidad de completar mi formación profesional permitiéndome ingresar al Programa de Doctorado en Ingeniería Química de la Universidad Complutense de Madrid y formar parte de un gran grupo de profesionales. Por compartir conmigo su inmensa experiencia profesional y personal, por orientarme, brindarme su apoyo, preocupación y comprensión durante los años en los que he tenido el agrado de ser su alumna.

A mi tutor, el Dr. Miguel Ladero Galán, por su tiempo, dedicación y buena voluntad a lo largo de estos años, guiándome siempre con buenas ideas, y ayudándome con todas las dudas (no han sido pocas) que han surgido a lo largo de estos años.

Al Dr. Aldo González Becerra, mi compatriota, por ofrecerme su ayuda y amistad desde el primer momento de conocerme, por su confianza, por sus gestiones, por su tiempo, dedicación, por su confidencialidad, por preocuparse por mí y su enorme corazón. Por ser un ejemplo de fortaleza y perseverancia, y su incalculable aporte a este difícil mundo de la ciencia.

Al grupo de investigación Físico-Química de los Procesos Industriales y Medio-Ambientales (FQPIMA) de la Universidad Complutense de Madrid, por darme la

oportunidad de ser parte de este gran grupo de investigación, por su apoyo y colaboración.

A mis compañeros Esteban Revilla, José M^a Carbajo, Sara Santos y Úrsula Fillat, de los laboratorio de Celulosa y Papel del CIFOR-INIA, por sus ayudas, ideas, consejos y risas, a lo largo de estos casi 5 años que nos conocemos. A Purificación Pereira y Nuria Gómez, por acogerme en el “laboratorio de arriba”, no solo dejándome un espacio para poder desarrollar mi trabajo, sino también por la amistad, los infinitos consejos, la familiaridad, la ayuda incondicional, soportarme y animarme siempre.

No puedo dejar de agradecer a mi familia, que aunque actualmente seamos “Los Vergara por el mundo”, siempre están presentes. A mis padres, María Mercedes y Eduardo, que han dedicado la vida a sus hijos, para entregarnos la mejor educación, por ser ejemplos de entrega, aguante y superación. Por su apoyo incansable e incondicional a pesar de todas las adversidades que increíblemente se han presentado a lo largo de estos años. Porque han confiado en mí a pesar de tener todo en contra, no han cuestionado mi decisión de vivir mi vida de esta forma y han tenido siempre una palabra de aliento sin importar los miles de kilómetros ni los horarios. También quiero recordar y agradecer a mis hermanos, Sebastián y Octavio, por su cariño, apoyo y compañía desde siempre. Los amo inmensamente.

Al resto de familia que he dejado en Chile, abuelos, tíos, primos, que a pesar de la distancia siempre están pendientes de mí, que se sienten orgullosos de mí y que siempre me reciben con los brazos abiertos cuando hago mis visitas exprés.

A mi familia española, que me ha adoptado y rescatado en innumerables ocasiones. Por su amor, amistad incondicional, compañía, consejos, ayuda, “hostias” en mis peores momentos, por ser mis confidentes, y por enseñarme a reírme de mí misma, “porque anda que no he dado juego”.... si no fuera por esos ratos, verdad? Estábamos destinados a encontrarnos.

A los amigos de la vida, por su compañía, en los buenos y malos momentos, y porque a pesar de la distancia, y los diferentes caminos que hemos elegido, se mantienen presentes y siempre se acuerdan de mí en los momentos críticos de mi estancia en Madrid y que

cuando nos vemos, parece que no han pasado los años. A los grandes amigos que tengo en Madrid. No podría haber dado con gente más bonita.

A Rosa, por sus sabias palabras, por explicarme tantas cosas, por ayudarme a poner orden en esta cabeza y en este corazón, por darme calma, por enseñarme que “las personas complejas...tenemos vidas complejas” y que no pasa nada.

A M.C.R. por la ayuda impagable, por tus consejos, por tus abrazos, por tu comprensión, por tu paciencia infinita, por la calma y la contención que me das, por recordarme eso de ser fuerte, si, si...constantemente. Pero por sobre todo, por ser una persona maravillosa y hacerme inmensamente feliz. Este tiempo junto a ti ha sido lo mejor que me podría haber pasado, sin lugar a dudas.

Finalmente, quisiera agradecer el apoyo del Ministerio de Economía y Competitividad (España), por financiar la realización de esta Tesis Doctoral a través del proyecto CTQ2013-45970-C2-1-R, al Gobierno Regional de Madrid (España) por su financiación a través del Proyecto RETO PROSOST P2013-MAE2907, y a la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) del Ministerio de Educación de Chile por financiar mis estudios y mi estancia en Madrid durante su realización, a través de CONICYT-DOCTORADO BECAS CHILE/BECAS CHILE/2015-72160108.

ABREVIATURAS

δ	Parámetro de solubilidad de Hildebrand.
AFEX	Explosión de fibra con amoníaco (“ammonia fiber explosion”).
ANOVA	Análisis de varianza.
BLC	Biomasa lignocelulósica.
BSA	Albúmina de suero bovino (“bovine serum albumine”).
CAI	Centro de Apoyo a la Investigación, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid.
CAS	Caseína.
CIFOR	Centro de Investigación Forestal.
CNME	Centro Nacional de Microscopía Electrónica.
CQ	Caracterización química.
CrI	Índice de cristalinidad (%).
CS	“Corn stubble”.
DD	“Degree of delignification”.
DRX	Difracción de rayos X.
DSA	Pre-tratamiento con ácido sulfúrico diluido (“diluted sulfuric acid”).
EDS	“Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy”.
EGA	Eliminación de grupos acetilos (%).
EH	“Enzymatic hydrolysis”.
EW	Pre-tratamiento con mezcla de etanol-agua.
FC	Factor de contribución.
f_h	Factor de conversión de glucosa a celulosa.
FL	Fracción líquida.
FPU	Unidades de papel filtro.
FS	Fracción sólida.
FT-IR	Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (“Fourier transform infrared spectroscopy”).

G	Unidad guayacilo de la lignina.
GA_o	Peso de grupos acetilos en la materia prima original (g).
GA_p	Peso de grupos acetilos en el material pre-tratado (g).
GD	Grado de deslignificación.
GEI	Gases de efecto invernadero.
G_o	Peso de glucanos en la materia prima original (g).
G_p	Peso de glucanos en el material pre-tratado (g).
GR	“Glucans recovery” (%).
H	Unidad p-hidroxifenilo de la lignina. Factor H (ecuación 1).
HA	Hidrólisis de arabinanos (%).
HE	Hidrólisis enzimática.
HMF	5-hidroximetilfurfural.
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (“high liquid performance chromatography”).
HX	Hidrólisis de xilanos (o “hydrolysis of xylans”) (%).
I₀₀₂	Intensidad de la difracción 002 a $2\theta = 22,5^\circ$.
I_{am}	Intensidad de difracción a $2\theta = 18^\circ$.
IEA	Agencia Internacional de Energía (“International Energy Agency”).
L/S	Relación líquido/sólido (L/kg).
LIA	Lignina insoluble en ácido.
L_o	Peso de lignina en la materia prima original (g).
L_p	Peso de lignina en el material pre-tratado (g).
LSA	Lignina soluble en ácido.
m_o	Masa seca inicial del material a hidrolizar (g).
m_g	Masa de glucosa en el hidrolizado.
MP	Material pre-tratado.
MS	Materia seca.

NREL	Laboratorio Nacional de Energía Renovable (“National Renewable Energy Laboratory”).
PEG	Polietilenglicol-6000.
P_o	Peso seco de la materia prima original (g).
p/p	Relación peso/peso (%).
P_{SP}	Peso seco del material sólido pre-tratado (g).
PT	Paja de trigo.
p/v	Relación peso/volumen (%).
RG	Recuperación de glucanos (%).
RID	Detector de índice de refracción (“refractive index detector”).
RM	Rastrojo de maíz.
RS	Recuperación de sólidos (%).
S	Unidad siringilo de la lignina.
SEM	Microscopía electrónica de barrido (“scanning electron microscopy”).
SMP	Leche desnatada en polvo (“skimmed milk powder”).
S/N	Relación señal/ruido.
t	Tiempo de pre-tratamiento (h) (factor H).
T	Temperatura (K) (factor H).
TW	Polisorbato 80 (Tween 80).
UI	Unidades internacionales.
UNFCCC	Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (“United Nations Framework Convention on Climate Change”).
UPF	Unidades de papel de filtro.
v/v	Relación volumen/volumen (%).
WS	“Wheat straw”.
X_o	Peso de xilano en la materia prima original (g).
X_p	Peso de xilano en el material pre-tratado (g).
y_i	Fracción de celulosa en el material (g/g).

- ÍNDICE -

RESUMEN	1
SUMMARY	7
OBJETO Y ALCANCE DEL TRABAJO	15
INTRODUCCIÓN	21
1. ANTECEDENTES	23
2. BIORREFINERÍAS	24
2.1. Productos finales en una biorrefinería.....	28
3. BIOMASA LIGNOCELULÓSICA.....	28
3.1. Estructura y composición de la biomasa lignocelulósica.....	29
3.1.1. Celulosa	30
3.1.2. Hemicelulosas.....	32
3.1.3. Lignina.....	34
3.1.4. Compuestos minoritarios.....	36
3.1.5. Pared celular	37
3.2. Residuos lignocelulósicos	38
3.2.1. Paja de trigo	39
3.2.2. Rastrojo de maíz	40
3.2.3. Plantas de escaso valor alimentario: <i>Cynara cardunculus L.</i>	41
4. Pre-tratamientos	41
4.1. Tipos de pre-tratamientos.....	43
4.1.1. Hidrólisis con ácido sulfúrico diluido	45
4.1.2. Pre-tratamientos con disolventes	47
4.1.2.1. Pre-tratamiento con etanol	49
4.2. Gasto energético según el pre-tratamiento	52
4.3. Compuestos de degradación.....	52
4.3.1. Derivados furanos.....	53
4.3.2. Ácidos débiles	53
4.3.3. Compuestos fenólicos.....	54
5. Hidrólisis enzimática	55
6. Bibliografía	58

MATERIALES Y MÉTODOS	71
1. Biomosas lignocelulósicas	73
1.1. Paja de trigo.....	73
1.2. Tallos de <i>Cynara Cardunculus L.</i>	73
1.3. Rastrojo de maíz.....	74
2. Reactivos y productos químicos	74
3. Equipos	76
3.1. Reactores	76
3.2. Equipos auxiliares	78
3.2. Equipos de análisis	80
3.3.1. Cromatografía líquida de alta resolución	80
3.3.2. Espectrofotometría	81
3.3.3. Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier	82
3.3.4. Microscopía electrónica de barrido	82
3.3.5. Difracción de rayos X y determinación de la cristalinidad	83
4. Procedimiento experimental	83
4.1. Pre-tratamiento de la biomasa lignocelulósica.....	84
4.2. Diseño de experimentos	86
5. Métodos de análisis.....	86
5.1. Análisis de las fracciones líquidas	86
5.1. Análisis de las fracciones sólidas	87
5.2.1. Recuperación de sólidos	87
5.2.2. Análisis del contenido de glucanos, xilanos y lignina (Klason).....	87
5.2.3. Análisis por espectroscopía y microscopía.....	88
5.2.3.1. Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier	88
5.2.3.2. Difracción de rayos X y determinación de la cristalinidad	88
5.2.3.3. Microscópica electrónica de barrido	89
6. Hidrólisis enzimática	89
6.1. Uso de aditivos para mejorar la hidrólisis enzimática	90
6.2. Determinación de azúcares y rendimiento de hidrólisis enzimática	91
6.3. Método de cálculo de parámetros y ajustes cinéticos	91
7. Bibliografía	92
JUSTIFICACIÓN DE LA UNIDAD TEMÁTICA DEL TRABAJO	97

1. Resumen de resultados y trabajos realizados	99
2. Relación de publicaciones.....	100
3. Justificación de la unidad temática del trabajo	101
3.1. Estudio y optimización de las variables del proceso de pre-tratamiento con mezclas de etanol-agua	101
3.2. Comparación entre el pre-tratamiento con una mezcla de etanol-agua y el pre-tratamiento con ácido sulfúrico diluido.....	113
3.3. Mejora de la sostenibilidad ambiental del proceso	120
3.4. Mejora de la digestibilidad enzimática de la paja de trigo	129
 CONCLUSIONES	 139
 CONCLUSIONS.....	 147
 ANEXO (Publicaciones).....	 155
Publicación I	
Publicación II	
Publicación III	
Publicación IV	
Publicación V	

LISTADO DE FIGURAS

- Figura 1.** Aprovechamiento en cascada dentro del concepto de biorrefinería.
- Figura 2.** Concepto de biorrefinería lignocelulósica (NREL, 2011).
- Figura 3.** Disposición espacial de la celulosa, hemicelulosa y lignina en las paredes celulares de la biomasa lignocelulósica. Imagen adaptada de Brandt et al. (2013).
- Figura 4.** Estructura molecular de la celulosa. Imagen adaptada de Börjesson and Westman (2015).
- Figura 5.** Esquema de la biomasa lignocelulósica. Imagen adaptada de Zhang (2008).
- Figura 6.** Esquema de la organización estructural de la celulosa. Imagen adaptada de Börjesson and Westman (2015).
- Figura 7.** Hexosas y pentosas constituyentes de las hemicelulosas. Imagen adaptada de Brandt et al. (2013).
- Figura 8.** Estructura química de una hemicelulosa encontrada en maderas coníferas (Galactoglucomanano). Imagen adaptada de Brandt et al. (2013).
- Figura 9.** Precursores de la lignina. Imagen adaptada de Brandt et al. (2013).
- Figura 10.** Estructura modelo de la lignina.
- Figura 11.** Esquema simplificado de la pared células de las fibras vegetales. Imagen adaptada de Sjöström (1993).
- Figura 12.** . Esquema del efecto del pre-tratamiento en la biomasa lignocelulósica. Imagen adaptada de Mosier et al. (2005).
- Figura 13.** Principales productos de degradación generados durante la etapa de pre-tratamiento de la biomasa lignocelulósica. Imagen adaptada de Almeida et al. (2007).
- Figura 14:** Representación esquemática de la hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica.
- Figura 15.** Materias primas preparadas para la etapa de pre-tratamiento. **(a)** paja de trigo (PT), **(b)** *Cynara Cardunculus L.* (cardo) y **(c)** rastrojo de maíz (RM).
- Figura 16.** Digestor (Tanque) (MAWP 2000 PSI/Autoclave Engineers, INC.), utilizado para realizar los diferentes pre-tratamientos.
- Figura 17.** Esquema general del proceso experimental. **BLC:** biomasa lignocelulosa; **PT:** paja de trigo; **cardo:** *Cynara Cardunculus L.*; **RM:** rastrojo de maíz;

EW: pre-tratamiento con una mezcla de etanol-agua; **L/S:** relación líquido/sólido (L/Kg) **DSA:** pre-tratamiento con ácido sulfúrico diluido; **MP:** material pre-tratado; **FL:** fracción líquida; **FS:** fracción sólida; **HE:** hidrólisis enzimática; **CQ:** caracterización química.

Figura 18. Gráficos de efectos principales para las relaciones S/N (mayor-mejor) para el fraccionamiento de la paja de trigo. (a) RG; (b) HX; (c) GD y (d) HE. **A:** tiempo; **B:** temperatura; **C:** relación L/S; **D:** contenido de etanol.

Figura 19. Gráficos de efectos principales para las relaciones S/N (mayor-mejor) para el fraccionamiento de los tallos *Cynara Cardunculus L.* (a) RG; (b) HX; (c) GD y (d) HE. **A:** tiempo; **B:** temperatura; **C:** relación L/S; **D:** contenido de etanol.

Figura 20. Recuperación de sólidos (RS, %) para la paja de trigo (PT), los tallos de *Cynara Cardunculus L.* (cardo) y el rastrojo de maíz (RM), en función del factor H, para los pre-tratamientos con mezclas de etanol-agua (EW) (—X—) y con ácido sulfúrico diluido (DSA) (—●—).

Figura 21. Recuperación de glucanos (RG, %) para la paja de trigo (PT), los tallos de *Cynara Cardunculus L.* (cardo) y el rastrojo de maíz (RM), en función del factor H, para los pre-tratamientos con mezclas de etanol-agua (EW) (—X—) y con ácido sulfúrico diluido (DSA) (—●—).

Figura 22. Hidrólisis de xilanos (HX, %) para la paja de trigo (PT), los tallos de *Cynara Cardunculus L.* (cardo) y el rastrojo de maíz (RM), en función del factor H, para los pre-tratamientos con mezclas de etanol-agua (EW) (—X—) y con ácido sulfúrico diluido (DSA) (—●—).

Figura 23. Grado de deslignificación (GD, %) para la paja de trigo (PT), los tallos de *Cynara Cardunculus L.* (cardo) y el rastrojo de maíz (RM), en función del factor H, para los pre-tratamientos con mezclas de etanol-agua (EW) (—X—) y con ácido sulfúrico diluido (DSA) (—●—).

Figura 24. Rendimiento de la hidrólisis enzimática (HE, %) para la paja de trigo (PT), los tallos de *Cynara Cardunculus L.* (cardo) y el rastrojo de maíz (RM), en función del factor H, para los pre-tratamientos con mezclas de etanol-agua (EW) (—X—) y con ácido sulfúrico diluido (DSA) (—●—).

Figura 25. Efecto de la reutilización del licor sobre la recuperación de sólidos y sobre su composición. Recuperación de sólidos (RS, %), recuperación de

glucanos (RG, %), hidrólisis de xilanos (HX, %), hidrólisis de arabinanos (HA, %), eliminación de grupos acetilos (EGA, %) y grado de deslignificación (GD, %).

Figura 26. Espectros obtenidos mediante espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR, “Fourier transform infrared spectroscopy”). **PT:** paja de trigo (sin pre-tratar); **S1 a S6:** sólidos pre-tratados obtenidos al reutilizar los licores de pre-tratamiento EW.

Figura 27. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM, “Scanning Electron Microscopy”). **a)** y **b)** Paja de trigo (PT); **c)** y **d)** S1 (sin reutilización); **e)** y **f)** S3; **g)** y **h)** S6. **Izquierda** (a, c, e): 200X. **Derecha** (b, d, f): 500X. Las flechas señalan las partículas en forma de esfera.

Figura 28. Composición de las fracciones líquidas (L1 a L6) obtenidas al reutilizar el licor de pre-tratamiento, al fraccionar (condiciones optimizadas) la paja de trigo (PT) mediante una mezcla de etanol-agua (EW).

Figura 29. Evolución del rendimiento de la hidrólisis enzimática (HE) de la paja de trigo sin pre-tratar (PT) y de los sólidos obtenidos por fraccionamiento con una mezcla de etanol-agua (EW) (condiciones optimizadas) (S1) y sucesivas reutilizaciones de los licores residuales (S2-S6).

LISTADO DE TABLAS

- Tabla 1.** Composición química de diferentes materiales lignocelulósicos (% en peso).
- Tabla 2.** Reactivos, procedencia y grado de pureza.
- Tabla 3.** Concentración de aditivos (surfactantes y proteínas).
- Tabla 4.** Asignación de los factores y sus niveles mediante una matriz de diseño L₉.
- Tabla 5.** Resultados experimentales y relación señal/ruido (S/N) para la paja de trigo. El criterio para la selección de los parámetros es el de mayor-mejor.
- Tabla 6.** Resultados de la prueba de confirmación del fraccionamiento de la paja de trigo y comparación con los valores predichos.
- Tabla 7.** Resultados experimentales y relación señal/ruido (S/N) obtenidos para los tallos *Cynara Cardunculus L.* El criterio para la selección de los parámetros es el de mayor-mejor.
- Tabla 8.** Resultados de la prueba de confirmación del fraccionamiento de *Cynara Cardunculus L.* y comparación con los valores predichos.
- Tabla 9.** Condiciones de pre-tratamientos con mezclas de etanol-agua y con ácido sulfúrico diluido.
- Tabla 10.** Índice de cristalinidad de la paja de trigo y los sólidos pre-tratados al reutilizar sucesivamente los licores de pre-tratamiento mediante mezclas de etanol-agua.
- Tabla 11.** Concentración de aditivos (surfactantes y proteínas) empleados.
- Tabla 12.** Condiciones de pre-tratamiento mediante mezclas de etanol-agua.
- Tabla 13.** Efectos del pre-tratamiento de la paja de trigo mediante mezclas de etanol-agua, en condiciones de baja y alta deslignificación.
- Tabla 14.** Efectos de la adición de surfactantes sobre el rendimiento de glucosa.
- Tabla 15.** Efectos de la adición de proteínas sobre el rendimiento de glucosa.

- RESUMEN -

La biomasa lignocelulósica (BLC) es la más abundante fuente renovable para la producción sostenible de bio-combustibles, biomateriales y productos químicos, con la ventaja de no competir por el terreno cultivable. Está compuesta mayoritariamente por celulosa, el componente más fácil de valorizar e inmersa en una matriz de hemicelulosas-lignina, por lo que precisa de un pre-tratamiento para hacerla accesible a la acción de enzimas y reactivos. Entre los pre-tratamientos más utilizados se encuentran la explosión con vapor, el tratamiento con ácido sulfúrico diluido (DSA, “diluted sulfuric acid”) y la extracción con agua caliente. En todos ellos, el gasto energético condiciona su viabilidad.

Los tratamientos con disolventes orgánicos-agua eliminan parte de las hemicelulosas y son eficaces para deslignificar. Uno de los disolventes orgánicos más utilizados es el etanol, por su disponibilidad, coste y eficacia. Permite obtener una fracción sólida, rica en celulosa, apta para su hidrólisis, por lo que se presenta como una alternativa para valorizar la BLC, especialmente con bajos aportes de energía.

El objetivo principal de esta Tesis es estudiar el **fraccionamiento selectivo de la BLC con una mezcla de etanol-agua (EW, “ethanol-water”)** con bajos requerimientos de energía. Con objetivos específicos:

- Estudiar la influencia de las condiciones de operación del pre-tratamiento EW sobre el fraccionamiento de la paja de trigo (PT) y de los tallos de *Cynara Cardunculus L.* (cardo).
- Comparar los resultados de los pre-tratamientos EW y DSA, para: PT, cardo y rastrojo de maíz (RM).
- Estudiar la reutilización de los licores residuales del pre-tratamiento EW como estrategia para reducir la energía en la recuperación del etanol.
- Mejorar la digestibilidad enzimática de la PT mediante el uso de aditivos, como surfactantes no iónicos y proteínas.

Para abordar los objetivos, se hizo un diseño experimental tipo Taguchi (L_9), evaluando: tiempo, temperatura, relación líquido/sólido (L/S) y contenido de etanol. Las variables se estudiaron a tres niveles. Las respuestas fueron: recuperación de glucanos (RG), hidrólisis de xilanos (HX), grado de deslignificación (GD) e hidrólisis enzimática (HE).

El estudio de la PT determinó el nivel de los efectos de las variables sobre las respuestas. El posterior análisis de varianza determinó que ninguna variable tiene efecto significativo sobre RG, que para HX y HE solo la temperatura tiene una influencia significativa, mientras que GD está influenciada por la temperatura y el contenido de etanol. Con esta información se eligen las condiciones óptimas de pre-tratamiento (60 min, 190 °C, 20 L/kg y 0,33 v/v de etanol). Los ensayos de confirmación no mostraron diferencias significativas con el resultado teórico previsto por el método Taguchi, y que, para HE, fueron de 83,4 % y de 86,7 %, respectivamente.

El estudio análogo efectuado para cardo mostró que solo el tiempo y la temperatura del pre-tratamiento tienen efecto sobre RG y que solo la temperatura afecta a los parámetros HX, GD e HE. Las condiciones óptimas del diseño Taguchi (60 min, 190 °C, 20 L/kg y 0,25 v/v de etanol) fueron verificadas experimentalmente, mostrando diferencias muy pequeñas entre los valores predichos (HE = 74,9 %) y los resultados experimentales (HE = 71,8 %).

Tras optimizar las variables del pre-tratamiento EW (para dos materias primas) se comparó su efectividad con el de DSA, para PT, cardo y RM. Se ensayaron diferentes niveles de energía en el pre-tratamiento; modificando solo el tiempo y la temperatura. Se comprobó que los tres materiales tienen un comportamiento diferente bajo ambos pre-tratamientos. EW se puede emplear con las tres BLCs y da lugar a un sólido rico en celulosa. PT ha mostrado mayor potencial para producir glucosa y requiere un bajo aporte de energía (84 %). EW es más eficaz que DSA, especialmente a bajos niveles de energía. Obtener altos valores de GD e HX son requisitos para lograr un sólido celulósico fácilmente hidrolizable a glucosa. Cardo y RM requieren de mayor aporte energético para producir sólidos fácilmente hidrolizables.

El siguiente estudio se orientó a reducir el gasto energético en la recuperación del disolvente. La estrategia es utilizar el licor residual de cada tratamiento en el siguiente, con nueva BLC. Para ello, se realizó una secuencia de tratamientos, utilizando las condiciones óptimas del pre-tratamiento EW encontradas para PT, en los que el licor utilizado en cada ensayo es el licor residual de la prueba anterior, con la adición de licor fresco para compensar las pérdidas. El análisis de los sucesivos sólidos ha mostrado que

la reutilización del licor residual es una alternativa para reducir el gasto energético en la recuperación del etanol. De esta forma, se modifica la composición del sólido producido, con una moderada pérdida de celulosa, aunque el rendimiento en glucosa aumenta hasta el 95 %. La velocidad de HE aumenta a medida que aumenta el número de reutilizaciones; lo que se atribuye a la acumulación de ácido acético en el líquido residual.

Por último, se intentó aumentar los rendimientos en la HE evitando la acción inhibidora de la lignina. Con este objetivo, se utilizaron surfactantes no iónicos y proteínas, que se aplicaron a dos sustratos con distinto contenido en lignina, obtenidos a partir de PT pretratada con una mezcla de EW. La estrategia de combinar baja deslignificación en el pretratamiento con el empleo de aditivos que eviten la inhibición de la lignina tuvo un éxito moderado. La albúmina de suero bovino (BSA) eleva al 75,7 % el rendimiento en glucosa del sustrato con más lignina, pero nunca supera el resultado que se obtiene sobre un sustrato más deslignificado (82,6 %), por lo que el contenido en lignina demuestra ser decisivo para lograr un alto rendimiento. La opción más favorable combina alta deslignificación con el empleo de caseína (CAS), una proteína barata, no probada con anterioridad, que eleva el rendimiento en glucosa hasta el 88,6 %. Un posible mecanismo que suponga el bloqueo de la lignina por los aditivos explicaría que los sustratos con mayor cantidad de lignina se benefician más del aditivo. Un exceso de aditivo supone una pérdida de rendimiento en glucosa, mayor en los sustratos más deslignificados que no precisarían de dosis elevadas de aditivo.

- SUMMARY -

Lignocellulosic biomass (LCB) is the most abundant renewable source for the sustainable production of bio-fuels, biomaterials and chemical products, with the advantage of not competing for arable land. LCB is composed mainly of cellulose, the component that is easiest to value and immersed in a matrix of hemicelluloses-lignin. Thus, a pre-treatment is needed to make cellulose accessible to the action of enzymes and reagents. The most commonly used pre-treatments include steam explosion, diluted sulfuric acid (DSA) and hot water extraction. In all of them, the energy expenditure determines its viability.

The treatments with organic solvents-water eliminate part of the hemicelluloses and are effective to eliminate the lignin from the biomass. One of the most used organic solvents is ethanol, due to its availability, cost and efficiency. The treatment with ethanol-water (EW) allows to obtain fraction rich in cellulose, suitable for hydrolysis, which is an alternative to valorize the LCB, especially with low energy contributions.

The main objective of this work is to study the **selective fractionation of the LCB with a mixture of ethanol-water (EW) with low energy requirements**. With specific objectives:

- To study of the influence of the operating conditions of the EW pre-treatment on the fractionation of wheat straw (WS) and the stems of *Cynara Cardunculus L.* (cardo).
- To compare the results of the pre-treatments EW and DSA, for three raw materials: WS, cardoon and corn stubble (CS).
- To study the reuse of waste liquors from pre-treatment with EW as a strategy to reduce energy needed in the recovery of ethanol.
- To improve the enzymatic digestibility of WS through the use of additives, such as non-ionic surfactants and proteins.

To address the objectives, an experimental Taguchi (L_9) design was made, evaluating: time, temperature, liquor/solid ratio (L/S) and ethanol content. These variables were studied at three levels. The considered answers were: glucans recovery (GR), hydrolysis of xylans (HX), degree of delignification (DD) and enzymatic hydrolysis (EH).

The study of WS determined the level of the effects of the variables on the responses. The subsequent analysis of variance determined that no variable has a significant effect on GR, and for HX and EH, only the temperature has a significant influence, while DD is influenced by temperature and ethanol content. With this information, the optimal pre-treatment conditions were chosen (60 min, 190 °C, 20 L/kg and 0.33 v/v of ethanol). Confirmation tests were performed and no significant differences were found with the theoretical result provided by the Taguchi method; for HE, the yields were 83.4 % and 86.7 %, respectively.

The analogous study carried out for the cardoon showed that only the time and temperature of the pre-treatment have an effect on GR, and that only the temperature affects the parameters HX, DD and EH. The optimal conditions of the Taguchi design (60 min, 190 °C, 20 L/kg and 0.25 v/v of ethanol) were verified experimentally, showing very small differences between the predicted values (HE = 74.9 %) and the experimental results (HE = 71.8 %).

After optimizing the EW pre-treatment variables (for two raw materials), the effectiveness of this pre-treatment was compared with that using DSA treatment. The comparison was made for WS, cardoon and CS. Different energy levels were tested in the pre-treatment, modifying the time and temperature. It was found that the three materials have a different behavior under both pre-treatments. EW can be used with the three LCBs yielding a solid rich in cellulose. WS has shown more potential to produce glucose and requires a low energy input (84%). EW treatment is more effective than DSA, especially at low energy levels. A high DD and high HX are required to achieve a cellulosic solid easily hydrolysable to glucose. The cardoon and the CS require greater energy input to produce easily hydrolysable solids.

The following study was aimed at reducing energy expenditure in solvent recovery. The strategy was to reuse the residual liquor in a sequential way; that is after the use with a LCB the liquor was used with a new LCB batch. For this experimentation, the optimal conditions of pre-treatment EW found for WS were used; then, a sequence of treatments was carried out in which the liquor used in each test is the residual liquor of the previous test, with the addition of liquor cool to compensate for the losses. The analysis of

successive solids has shown that the reuse of residual liquor is an alternative to reduce energy expenditure in the recovery of ethanol. In this way, the composition of the produced solid is modified, with a moderate loss of cellulose, although the glucose yield increases up to 95 %. The rate of EH increases as the number of re-uses increases; what is attributed to the accumulation of acetic acid in the residual liquid.

Finally, it was tried to increase the yields in the EH avoiding the inhibiting action of the lignin. Non-ionic surfactants and proteins were used in three different concentrations, which were applied to two substrates with different lignin content, obtained from WS pretreated with an EW mixture. The strategy of combining low delignification in the pre-treatment with the use of additives, that prevent the inhibition of lignin, was moderately successful. The bovine serum albumin (BSA) increases the glucose yield of the substrate with more lignin to 75.7 %, but never exceeds the result obtained with a more de-lignified substrate (82.6 %); thus, the lignin content is decisive to achieve high glucose yield. The most favorable option combines high DD with the use of casein (CAS), a cheap protein, not previously tested, which raises glucose yield up to 88.6 %. A possible mechanism is to assume the blockade of the lignin by the additives, which would explain that the substrates with greater amount of lignin benefit more from the additive use. An excess of additive supposes a loss of yield in glucose, greater in the more delignified substrates that would not require high doses of additive.

**- OBJETIVO Y ALCANCE
DEL TRABAJO -**

OBJETIVOS GENERALES

La presente Tesis Doctoral se enmarca dentro del proyecto “Utilización eficiente de la Biomasa Lignocelulósica: Biorrefinería integrada” (CTQ2013-45970-C2-2-R) del Programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación Orientada a los Retos de la Sociedad (2013). Este trabajo ha sido desarrollado en el Laboratorio de Celulosa y Papel del Centro de Investigación Forestal (CIFOR) perteneciente al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), en colaboración con el Grupo de Investigación Fisicoquímica de los Procesos Industriales y Medioambientales (FQPIMA) del Departamento de Ingeniería Química y Materiales de la Universidad Complutense de Madrid (UCM).

El citado proyecto cuenta con tres etapas y su principal objetivo es desarrollar un proceso integrado de valorización y aprovechamiento de los componentes principales de la biomasa lignocelulósica (BLC). La primera etapa es el ***pre-tratamiento*** de la BLC mediante el uso de un disolvente orgánico, con el fin de alterar su estructura y separar sus componentes principales en tres fracciones: celulosa, hemicelulosa y lignina. La segunda etapa se basa en la ***hidrólisis enzimática (HE)*** de las fracciones que contienen polisacáridos (celulosa y hemicelulosas) y de esta forma obtener una fracción líquida constituida por monosacáridos (glucosa y xilosa). Finalmente, la tercera etapa se centra en el desarrollo de las mejores condiciones operativas para la obtención de dos sustancias químicas de plataforma para su posterior procesamiento a compuestos con un alto valor agregado; los procesos considerados en esta última etapa son la ***producción de isobutanol*** a partir de glucosa con cepas genéticamente modificadas de *Escherichia coli*, y la producción de ***ácido succínico*** a partir de xilosa con cepas naturales de *Actinobacillus succinogenes*.

En base a estas consideraciones, el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral se centra en el estudio de la primera de las etapas descritas: ***el fraccionamiento selectivo de la BLC con mezclas de etanol-agua*** (EW, “ethanol-water”), utilizando condiciones de reacción con bajos requerimientos de energía, el que se evaluará a través del parámetro denominado Factor H. Como biomasa de referencia se utilizará paja de trigo (PT), tallos de *Cynara Cardunculus L.* (cardo) y rastrojo de maíz (RM). Para determinar la calidad

del material sólido obtenido en las diferentes condiciones ensayadas se utilizará como criterio el rendimiento de la HE, considerándola como una medida de la accesibilidad enzimática del material.

Para alcanzar este objetivo general se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar la influencia de los parámetros operativos (tiempo, temperatura, relación líquido/sólido y contenido de etanol) del pre-tratamiento EW sobre el fraccionamiento de PT y cardo. Se procederá a optimizar las condiciones de pre-tratamiento a través de un diseño de experimento de tipo Taguchi (L₉).
- Comparar el pre-tratamiento EW con el pre-tratamiento con ácido sulfúrico diluido (DSA, “diluted sulfuric acid”) para los tres materiales seleccionados (PT, cardo y RM) a diferentes niveles de consumo de energía, valorando la selectividad del fraccionamiento y la aptitud de los sólidos obtenidos para ser hidrolizados enzimáticamente.
- Estimar la posibilidad de reutilizar los licores residuales del pre-tratamiento como posible estrategia para reducir la energía empleada en la recuperación del etanol del licor en el pre-tratamiento EW, mejorando el balance económico del proceso.
- Mejorar la digestibilidad enzimática de PT, mediante el uso de aditivos. Se probará el empleo de surfactantes no iónicos y proteínas, sistematizando el estudio.

- INTRODUCCIÓN -

1. ANTECEDENTES

La población mundial actual se estima en 7.500-7.600 millones de personas; con un nacimiento y una muerte cada 8 y 10 segundos, respectivamente, dicha población mundial aumentará a más de 8.000 millones para el año 2030, y puede que alcance los 12.000 millones para 2050 (USCB, 2019). Este factor, junto con el aumento del nivel de vida, generará una expansión de la producción industrial como respuesta al aumento del consumo de las necesidades básicas y también del consumo de energía per cápita (Nanda et al., 2015). En la actualidad, la principal fuente mundial de energía y manufactura de productos químicos es de origen fósil. La Agencia Internacional de Energía (IEA, “International Energy Agency”) informó que el 81,4 % de la demanda total de energía provenía de combustibles fósiles en 2015, en comparación con el 81,1 % de 2014 (IEA, 2017). Esta situación plantea graves problemas, tales como:

- La incertidumbre en el suministro debido al agotamiento de las reservas de los principales combustibles fósiles que no son renovables.
- La contaminación ambiental y el cambio climático asociados a su uso.
- El precio y la dependencia del petróleo, que convierte el tema de la seguridad energética en un importante problema político (Cherubini, 2010; Moncada et al., 2016).

Existe evidencia científica de que las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), como el dióxido de carbono (CO_2), el metano (CH_4) y el óxido nitroso (N_2O) derivan principalmente de los combustibles fósiles y de las actividades humanas, lo que se asocia al peligro de cambio climático del planeta como resultado (Cherubini, 2010). En 2016, se determinó que las emisiones globales de CO_2 provenientes de los combustibles fósiles se han más que duplicado desde principios de los años setenta y que aumentaron alrededor de un 40 % desde el año 2000 como resultado del aumento de la producción industrial mundial (IEA, 2017). A raíz de esto, en diciembre de 2015, 195 países adoptaron el acuerdo de París para combatir el cambio climático bajo la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (UNFCCC, “United Nations Framework Convention on Climate Change”). Este hecho histórico, fue el primer acuerdo internacional sobre el clima que extiende las obligaciones de mitigación de GEI, tanto a

países desarrollados como a los que están en desarrollo. De esta forma, se pretende que las emisiones de GEI anuales alcancen el máximo lo más pronto posible y emprender reducciones rápidas para lograr, en la segunda mitad de este siglo, emisiones netas nulas (IEA, 2018; UNFCCC, 2015).

Estos problemas, se han convertido en la fuerza impulsora que ha estimulado la búsqueda de materias primas sostenibles y de nuevas tecnologías para su transformación en productos y en fuentes de energía, para de esta forma lograr la transición desde la economía basada en recursos fósiles no renovables a recursos biológicos renovables y sostenibles (Gnansounou and Pandey, 2017).

2. BIORREFINERÍAS

De esta forma, se ha desarrollado el concepto de *biorrefinería*, identificada como la ruta más prometedora para la creación de una nueva industria basada en recursos biológicos, análoga a la refinería de petróleo y que puede producir múltiples productos químicos, materiales, combustibles y energía. Los nuevos productos reemplazarían a los de la refinería de petróleo, pudiendo ser las mismas especies químicas pero obtenidas a partir de biomasa, o moléculas diferentes pero con una función equivalente a las obtenidas a partir de recursos fósiles (Cherubini, 2010).

En 2009, el Laboratorio Nacional de Energías Renovables de Estados Unidos (NREL, “International Renewable Energy Laboratory”) definió una biorrefinería como una instalación que integra procesos y equipos de conversión de biomasa para producir combustibles, energía y productos químicos a partir de biomasa, aprovechando las diferencias en sus componentes y buscando maximizar el valor de la materia prima. Por ejemplo, una biorrefinería, en lo que se conoce como *aprovechamiento en cascada* (Figura 1), puede producir uno o varios productos químicos de gran valor añadido en pequeñas cantidades, además de grandes cantidades de combustibles de bajo valor, a la vez que genera electricidad y calor para su venta y/o propio uso. De esta forma, los productos de alto valor añadido mejoran la rentabilidad del proceso, los altos volúmenes de biocombustibles ayudan a solventar las necesidades energéticas y la generación de

electricidad reduce los costes y las emisiones de GEI. Además, se puede lograr una gestión más efectiva de los residuos.

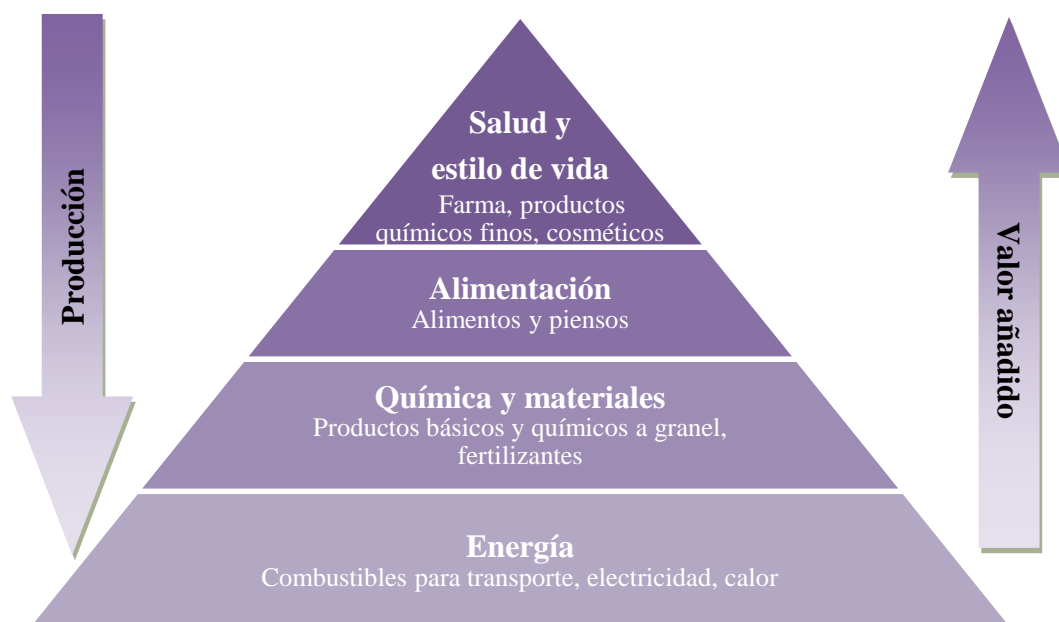


Figura 1. Aprovechamiento en cascada dentro del concepto de biorrefinería.

Con el objetivo de cumplir con la definición anteriormente descrita se ha establecido que las biorrefinerías deben cumplir con los siguientes principios (Koltuniewicz, 2014; Koltuniewicz and Dabkowska, 2016):

- Las materias primas utilizadas deben provenir única y exclusivamente de biomasa procesada.
- Todos los productos y reactivos utilizados deben ser biodegradables.
- Todos los procesos involucrados deben cumplir con los conceptos de Química Verde y de Tecnologías Limpias.

Por otro lado, es posible clasificar las biorrefinerías según diversos criterios. NREL las divide en 5 plataformas, en función de la materia prima, las tecnologías utilizadas y los productos obtenidos (Wright et al., 2006):

- 1) **Plataforma Bioquímica (Plataforma de procesamiento de azúcares):** Utiliza como materia prima materiales lignocelulósicos y biomasa rica en azúcares o en almidón, utilizando tecnologías para producir o extraer los azúcares y convertirlos posteriormente en bioetanol o productos químicos. La lignina puede ser quemada para generar electricidad y calor, o procesada para producir combustibles y productos químicos. Utiliza los siguientes procesos: hidrólisis (química o enzimática), fermentación, biotransformación, procesos químicos y catalíticos.
- 2) **Plataforma Termoquímica (Plataforma de procesamiento de gas de síntesis):** Utiliza como materia prima materiales lignocelulósicos, además de plásticos, cauchos y otros residuos. Se basa en la conversión de materiales sólidos en combustibles gaseosos o líquidos mediante calentamiento en una atmósfera limitada de oxígeno (gasificación) o en ausencia de oxígeno (pirólisis). Los productos obtenidos en esta plataforma son: gas de síntesis, aceite de pirólisis, productos químicos de alto valor y combustibles líquidos o gaseosos.
- 3) **Plataforma de procesamiento de biogás:** Utiliza como materia prima efluentes líquidos o estiércol para, mediante digestión anaerobia, producir CO₂ y CH₄, los que pueden ser utilizados en la obtención de productos químicos y combustibles.
- 4) **Plataforma de cadenas ricas en carbono (Plataforma de procesamiento de aceite):** Utiliza como materia prima aceites de plantas (soja, colza, maíz o palma), que mediante transesterificación se transforman en biodiesel. Como subproducto se obtienen ácidos grasos y glicerina, los que pueden ser utilizados para obtener otros productos químicos.
- 5) **Plataforma de productos de plantas:** Logra que ciertas plantas produzcan gran cantidad de materia prima o productos químicos o incluso compuestos que la planta no produce naturalmente, mediante ingeniería genética y reproducción selectiva.

NREL indica que las líneas más prometedoras son las que utilizan materias primas de origen lignocelulósico (Plataforma Bioquímica y Plataforma Termoquímica), definiendo

de esta forma el concepto de *biorrefinería lignocelulósica* (Figura 2), la que además de ser asequible y utilizar una amplia gama de materias primas, tiene capacidad para producir una amplia variedad de productos.

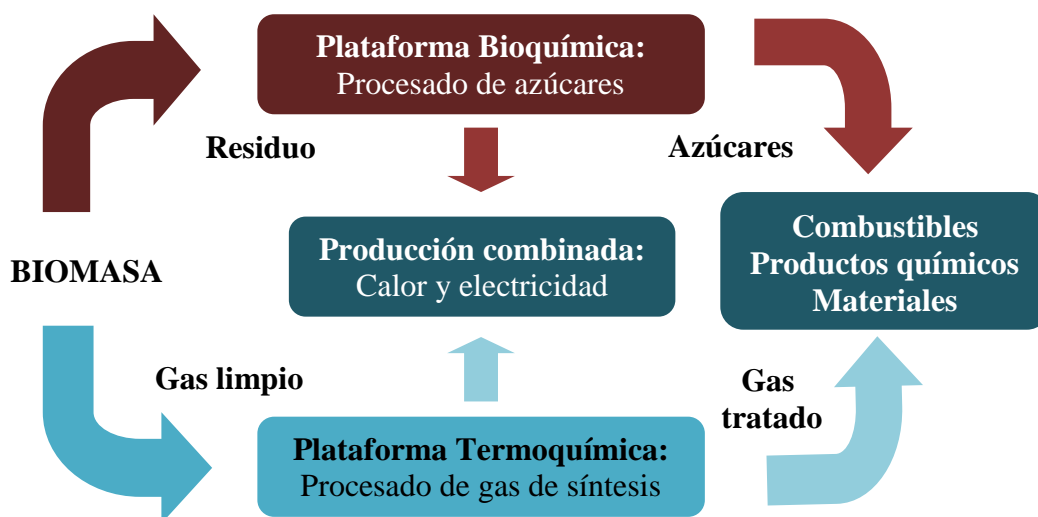


Figura 2. Concepto de biorrefinería lignocelulósica (NREL, 2011).

Otra clasificación del concepto de biorrefinería, se basa en las materias primas utilizadas, dividiéndola en tres generaciones (Palmeros Parada et al., 2017):

- **Biorrefinería de primera generación (1G):** Utiliza cultivos de carácter alimentario (maíz, caña de azúcar o aceites vegetales de soja o palma) para la obtención de azúcares y producir etanol y biodiesel. Presenta problemas, como son, no diversificar las materias primas ni los productos, competir por el terreno cultivable con la producción de alimentos y el deterioro del suelo.
- **Biorrefinería de segunda generación (2G):** Surge para evitar los problemas planteados por las biorrefinerías 1G. Utiliza plantas no involucradas en la alimentación o residuos lignocelulósicos como, por ejemplo, paja de trigo, rastrojo de maíz, o bagazo de caña de azúcar. Entre sus ventajas se pueden citar una mayor diversificación en los productos, la abundancia de las materias primas y la no competencia con la producción de alimentos.

- **Biorrefinería de tercera generación (3G):** Utilizan materias primas que provienen de cultivos microbianos, como por ejemplo las microalgas.

2.1. Productos finales en una biorrefinería

Los productos obtenidos a partir de una biorrefinería lignocelulósica deben poder reemplazar a los productos químicos de base y a los combustibles provenientes de las refinerías de petróleo. Los más importantes, pueden ser clasificados en dos categorías (Cherubini, 2010):

1) Biocombustibles energéticos:

- Gaseosos (biogás, gas de síntesis, hidrógeno y biometano).
- Sólidos (pellets, lignina y carbón vegetal).
- Líquidos (bioetanol, biodiesel, combustibles Fischer-Tropsch y bio-aceites).

2) Productos de base biológica:

- Productos químicos (industria química fina, intermedios químicos, a granel).
- Ácidos orgánicos (succínico, láctico, itacónico y otros derivados de azúcar).
- Polímeros y resinas (plásticos a base de almidón, resinas fenólicas y de furano).
- Biomateriales (paneles de madera, pulpa, papel, fibras de celulosa).
- Productos para alimentación animal y humana.
- Fertilizantes.

3. BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

La biomasa lignocelulósica (BLC) es el recurso renovable biológico más abundante en la naturaleza y, debido a que no forma parte de la cadena alimentaria, es una materia prima atractiva y relativamente económica (Brandt et al., 2013). Es el resultado de la fotosíntesis de las plantas, que convierten el CO₂ y el agua en materia orgánica mediante la energía solar, y tiene la ventaja de ser biodegradable y renovable (Dey and Brinson,

1984). La BLC para uso industrial puede provenir de diversas fuentes: residuos agrícolas y forestales, residuos municipales (residuos orgánicos y del papel) y cultivos energéticos (dedicados a biocombustibles) (Brandt et al., 2013).

3.1. Estructura y composición de la biomasa lignocelulósica

La estructura y composición química de la BLC, muy variable debido a influencias genéticas y ambientales, es un factor clave que afecta su utilización dentro del concepto de biorrefinería (Lee et al., 2007). Los polímeros que la conforman se asocian entre sí formando una hetero-matriz (Figura 3), con una composición relativa variable según el tipo, la especie, la edad, la etapa de crecimiento e incluso la fuente de la biomasa (Fengel and Wegener, 1989). Específicamente, está formada por distintas proporciones de tres componentes principales; celulosa ($C_6H_{10}O_5$)_x, hemicelulosa ($C_5H_8O_4$)_m y lignina [$C_9H_{10}O_3(OCH)_{0,9-1,7}$]_n (Balat, 2011; Brandt et al., 2013), además de otros componentes minoritarios que no forman parte de la pared celular, como extraíbles, terpenos, alcaloides, proteínas, fenoles, pectinas, gomas, resinas, diferentes grasas y cenizas que contienen principalmente Ca, K y Mg; compuestos inorgánicos que persisten después de la incineración del materia (Fengel and Wegener, 1989).

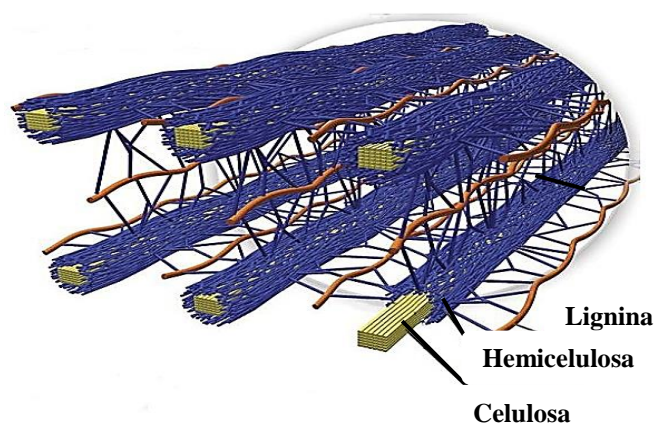


Figura 3. Disposición espacial de la celulosa, hemicelulosa y lignina en las paredes celulares de la biomasa lignocelulósica. Imagen adaptada de Brandt et al. (2013).

La Tabla 1, adaptada a partir de datos de publicados por Carroll and Somerville (2008), muestra la composición de varios materiales lignocelulósicos de interés industrial.

Tabla 1. Composición química de diferentes materiales lignocelulósicos (% en peso).

Biomasa	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Bagazo de caña de azúcar	39,0	24,9	23,1
Rastrojo de maíz	37,7	25,3	18,6
Paja de trigo	32,6	22,6	16,8
<i>Pinus radiata</i>	41,7	20,6	25,9
Eucalipto	48,1	12,7	26,9
“Switchgrass”	31,0	24,4	17,6

3.1.1. Celulosa

La celulosa es el polímero más abundante en la naturaleza y el principal constituyente (40-60 %, en peso) de la pared celular de árboles y plantas. También se puede encontrar en varias especies bacterianas (por ejemplo: *Acetobacter*, *Rhizobium* y *Agrobacterium*), algas y tunicados (Brown, 2004). Es considerado uno de los polímeros naturales más importantes y una fuente clave de materiales renovables. Se trata de un homopolímero lineal de unidades de D-glucopiranosas que se unen entre sí mediante enlaces β -1,4-glucosídicos y en los que cada unidad de glucosa está girada 180 ° con respecto a su vecina, y cuyo peso molecular varía aproximadamente desde 1.000 hasta 10.000 Da. Dos unidades de glucosa, unidas por eliminación de una molécula de agua entre grupos hidroxilos en C₁ y C₄, forman su unidad repetitiva; la celobiosa. La cadena de celulosa presenta asimetría química, debido a que uno de sus extremos es reductor (hemiacetal) y el otro es no reductor (grupo hidroxilo) lo que afecta su reactividad (Figura 4) (Börjesson and Westman, 2015; Fengel and Wegener, 1989).

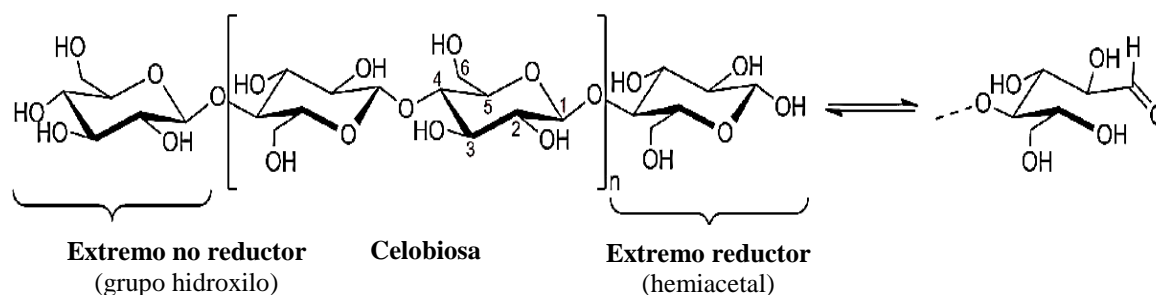


Figura 4. Estructura molecular de la celulosa. Imagen adaptada de Börjesson and Westman (2015).

La unidad organizativa más simple, que resulta de la combinación de aproximadamente 36 moléculas de celulosa es la microfibrilla elemental o protofibrilla, con un diámetro de 3-10 nm. Un grupo de unas 20 microfibrillas elementales, cohesionadas por la matriz de hemicelulosas y lignina se unen para constituir una microfibrilla, cuyo diámetro varía entre 20-40 nm, dependiendo de la procedencia de la celulosa. Estas, a su vez, se agrupan formando la fibrilla, con una anchura aproximada de 2000 Å, considerada la unidad estructural de las fibras vegetales de celulosa (Figura 5) (Börjesson and Westman, 2015; Rowell, 2012; Zhang and Lynd, 2004).

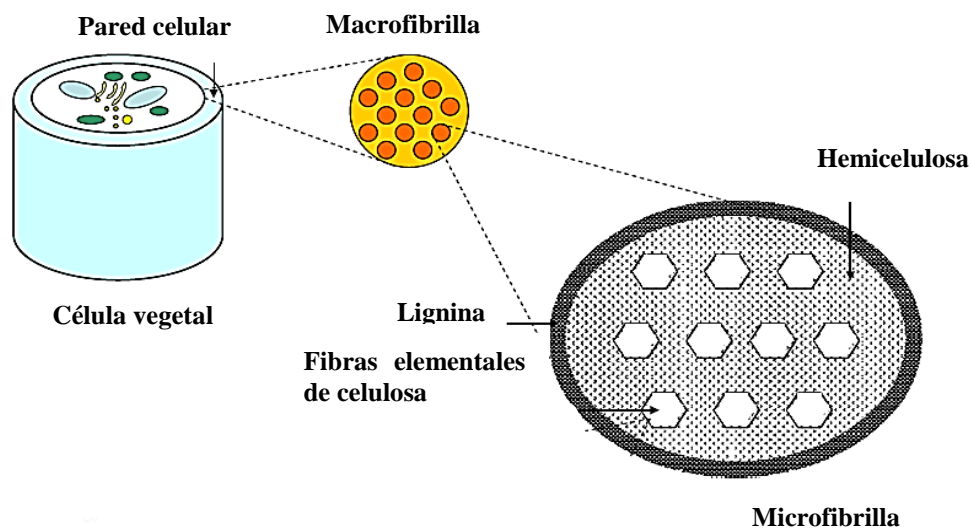


Figura 5. Esquema de la biomasa lignocelulósica. Imagen adaptada de Zhang (2008).

Las cadenas poliméricas de celulosa pueden estar organizadas en distintos grados, encontrándose dos regiones (Figura 6). La región amorfa formada por la fracción de celulosa menos ordenada, debido a dislocaciones en las cadenas y a la presencia de cadenas cortas, por lo que es fácilmente atacada por solventes, enzimas y reactivos. Y la región cristalina que se encuentra altamente ordenada y compacta, lo que la hace resistente a la hidrólisis (Börjesson and Westman, 2015; Zhang and Lynd, 2004).

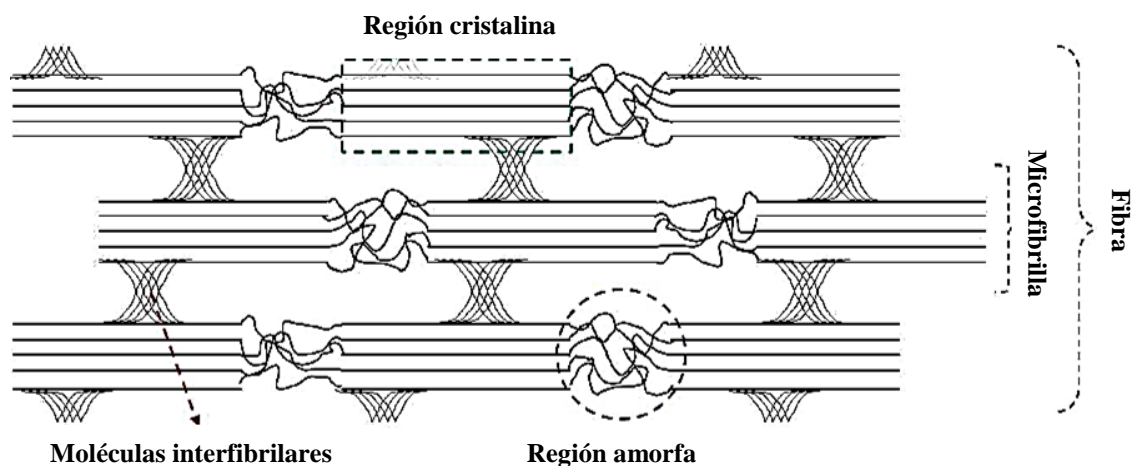


Figura 6. Esquema de la organización estructural de la celulosa. Imagen adaptada de Börjesson and Westman (2015).

La alta cristalinidad, la barrera que supone la matriz hemicelulosas-lignina y el elevado peso molecular de la celulosa hacen que en su estado natural, sea insoluble en agua y en la mayoría de los disolventes orgánicos convencionales, aspecto que condiciona su posterior tratamiento (Shrotri et al., 2018).

3.1.2. Hemicelulosas

Las hemicelulosas son los segundos polisacáridos vegetales más abundantes (20-40 %, en peso) después de la celulosa. Tienen una estructura corta, compleja, altamente ramificada, compuesta principalmente por pentosas (xilosa y arabinosa), hexosas (manosa, glucosa y galactosa) y en algunos casos por azúcares acetilados (Figura 7) (Bajpai, 2016; Balat, 2011).

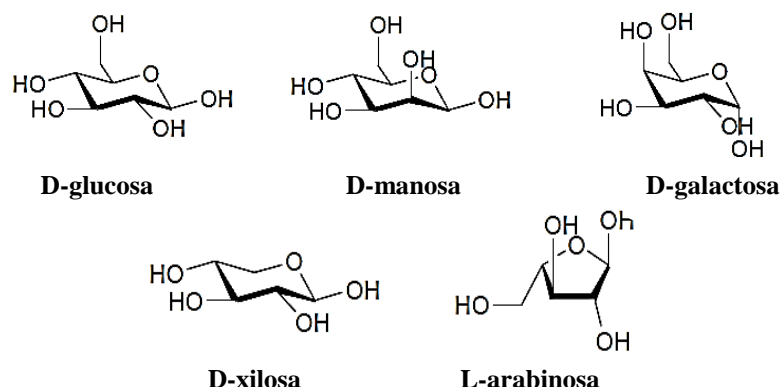


Figura 7. Hexosas y pentosas constituyentes de las hemicelulosas. Imagen adaptada de Brandt et al. (2013).

Su esqueleto es un heteropolímero con ramas cortas unidas por enlaces β -(1,4)-glicosídicos y, en ocasiones, por enlaces β -(1,3)-glicosídicos. Tienen un peso molecular más bajo que la celulosa y debido a su naturaleza no cristalina y ramificada, son más susceptibles a la despolimerización que la celulosa (especialmente en condiciones ácidas), aspecto que es aprovechado por muchas estrategias de fraccionamiento (Balat, 2011; Brandt et al., 2013; Fengel and Wegener, 1989). Su composición varía considerablemente en diferentes biomásas; las hemicelulosas de las maderas frondosas contienen principalmente xilanos (Figura 8), mientras que en las de maderas coníferas abundan los glucomananos (Balat, 2011; Isikgora and Becer, 2015).

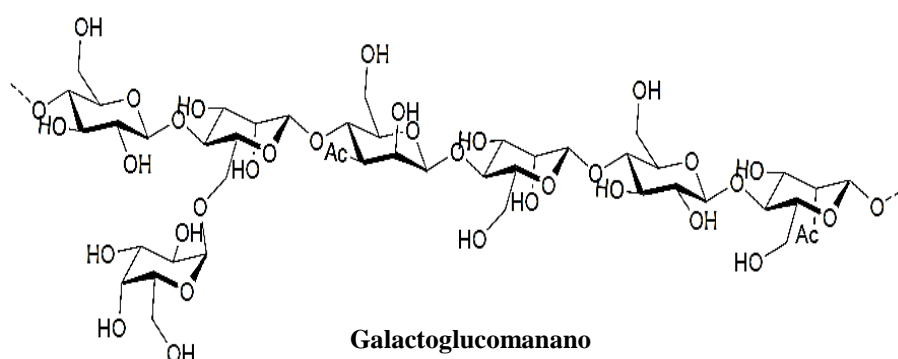


Figura 8. Estructura química de una hemicelulosa encontrada en maderas coníferas (Galactoglucomanano). Imagen adaptada de Brandt et al. (2013).

Las hemicelulosas se asocian con la lignina y forman parte del cementante de la pared celular de las plantas, proporcionando resistencia estructural al dar consistencia a las fibrillas de celulosa (Isikgora and Becer, 2015).

3.1.3. Lignina

Es un polímero aromático, insoluble en agua, amorfo, altamente complejo, con una estructura ramificada de alto peso molecular y compuesto por unidades de fenilpropano. Los precursores de la biosíntesis de lignina son el alcohol *p*-coumarílico, el alcohol coniferílico y el alcohol sinapílico (Higuchi, 1990). Estos tres alcoholes aromáticos dan lugar, mediante deshidrogenación enzimática y posterior polimerización, a unidades *p*-hidroxifenilo (H), guayacilo (G) y siringilo (S), respectivamente (Figura 9) (Brandt et al., 2013; Dey and Brinson, 1984). Tanto el tipo de unidades como su porcentaje, dependen estrechamente de la naturaleza del material lignocelulósico (Fengel and Wegener, 1989). Así, la lignina que encontramos en maderas coníferas puede considerarse como el resultado de la polimerización de unidades G, la de las maderas frondosas en mayor medida de unidades S y G. Por otro lado, la lignina más compleja es la que se encuentra en plantas herbáceas, donde además de las unidades G y S, se encuentran las unidades H.

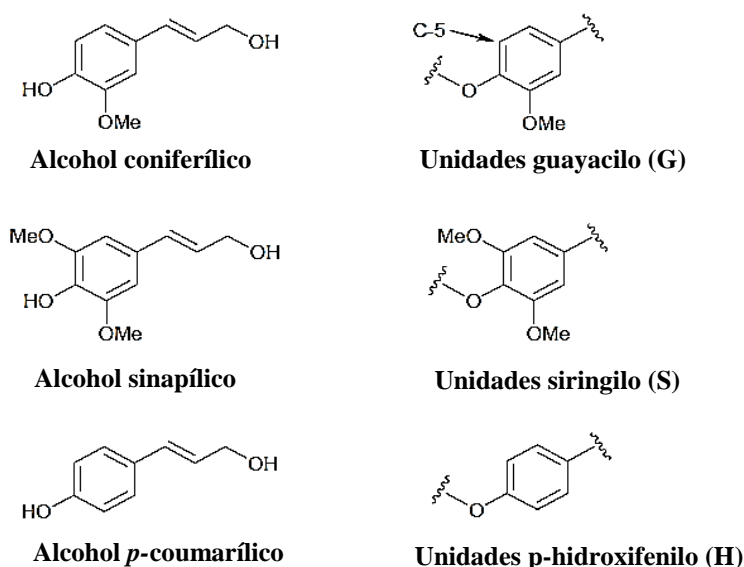


Figura 9. Precursores de la lignina. Imagen adaptada de Brandt et al. (2013).

Dentro de la estructura de la lignina (Figura 10), las unidades de fenilpropano (cualquiera que sea su origen) están conectadas entre sí aleatoriamente, por lo que no es posible atribuirle una estructura definida, por enlaces de tipo éter (C-O-C) y carbono-carbono (C-C), en los que participan los anillos aromáticos y las cadenas laterales de cada unidad. Aproximadamente el 50 % de todos los enlaces entre subunidades son del tipo éter β -O-4' (guayacil.glicerol- β -aril éter), clave en procesos de despolimerización como el que tiene lugar durante la producción comercial de pasta de celulosa (Kraft). Por el contrario, enlaces como β -5' (fenil.cumarano), β -1' (diaril.propano), β - β' (resinol), 5-5' (bifenilo) y 4-O-5' (difenil-éter) son más resistentes.

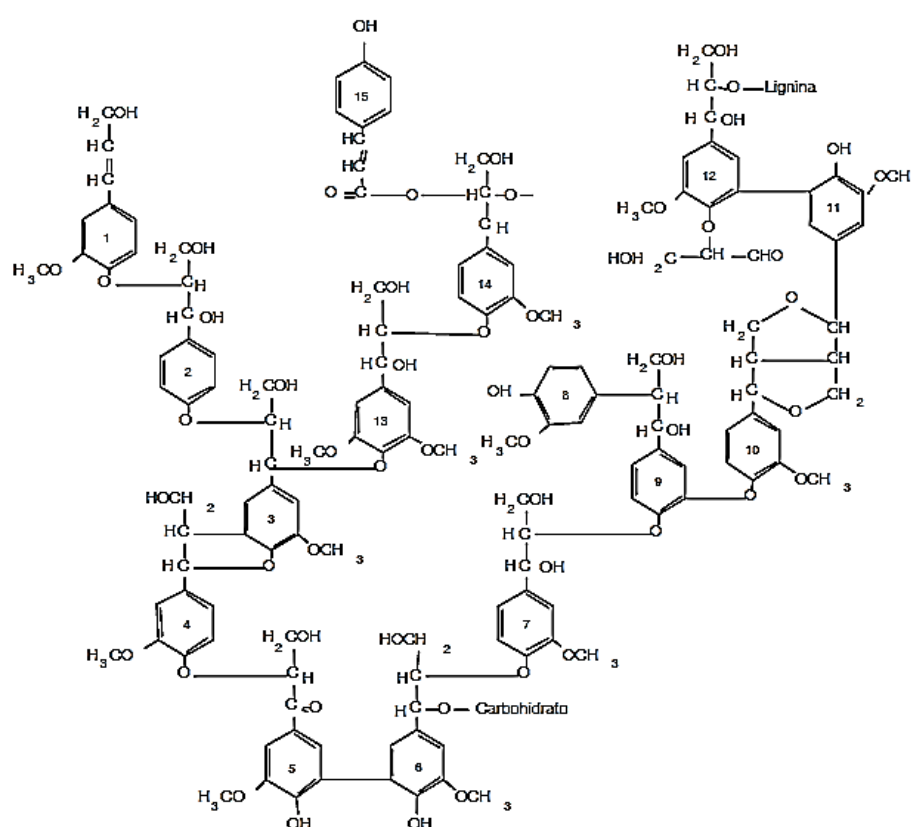


Figura 10. Estructura modelo de la lignina.

Su estructura tridimensional e hidrofóbica ha sido identificada como uno de los principales obstáculos para la deconstrucción de la BLC. Al estar unida a la celulosa y a las hemicelulosas a través de enlaces covalentes, formando los denominados complejos lignina-hidratos de carbono (LCC, “lignin-carbohydrate complex”), actúa como una barrera difícil de penetrar y recalcitrante a la degradación enzimática. Así mismo, esta

mezcla de complejidad de la lignina y de su asociación a los hidratos de carbono es la razón de la dificultad de su extracción y de que, como consecuencia, los procesos industriales de producción de pasta de celulosa (procesos sulfato y sulfito) necesiten de condiciones rigurosas para deslignificar la madera.

La lignina se encuentra covalentemente unida a los xilanos o glucomananos de la lignocelulosa, dependiendo de si se trata de maderas frondosas o de maderas coníferas, respectivamente (Fengel and Wegener, 1989). Impregna también los espacios entre las fibras celulósicas, funcionando como pegamento que fortalece la estructura de la BLC, proporcionando resistencia al agua, refuerzo estructural y resistencia al ataque biológico y químico (Brandt et al., 2013; Dey and Brinson, 1984; Isikgora and Becer, 2015).

3.1.4. Componentes minoritarios

Existen compuestos presentes en menor proporción, que no se encuentran en la pared celular de las plantas y que tienen una gran influencia en las propiedades de los diferentes materiales lignocelulósicos. Estos, se clasifican principalmente en:

- **Cenizas:** Fracción inorgánica del material cuya composición está formada por sales inorgánicas de calcio, potasio, sodio, magnesio y sílice. Puede proceder tanto del material mineral de las plantas originales como de la contaminación del suelo. Su contenido se mide como el material inorgánico que queda después de la combustión completa de la materia prima en un horno mufla a 525 °C (Fengel and Wegener, 1989; Thammasouk et al., 1997).
- **Extractivos:** Grupo heterogéneo de compuestos orgánicos, de bajo peso molecular, tanto lipofílicos como hidrofílicos, por lo que pueden ser extraídos por solventes polares o no polares. Consisten principalmente en hidratos de carbono, terpenos, ácidos alifáticos, ácidos aromáticos, alcoholes, flavonoides, taninos, alcaloides, ligninas solubles y ceras. El contenido y composición varía ampliamente entre las especies, la ubicación y la estación. Son cruciales para

algunas propiedades de la BLC como el color, el olor y la protección contra los parásitos (Fengel and Wegener, 1989; Sjöström, 1993).

3.1.5. Pared celular

Los componentes de la BLC, previamente descritos, se disponen para formar la pared de las células vegetales (Figura 11). Entre las células existe una delgada capa llamada laminilla media (LM), compuesta principalmente por lignina y, en menor medida, por material péctico (hidratos de carbono coloidales de alta peso molecular solubles en agua) (Sjöström, 1993). Su función es hacer de cementante de las células para dar consistencia y formar los tejidos (Fengel and Wegener, 1989). Adyacente a la LM se encuentra la pared primaria (P), una capa compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosas y lignina, donde las fibrillas de celulosa se disponen en finas capas entrecruzadas y completamente embebidas en lignina (Fengel and Wegener, 1989).

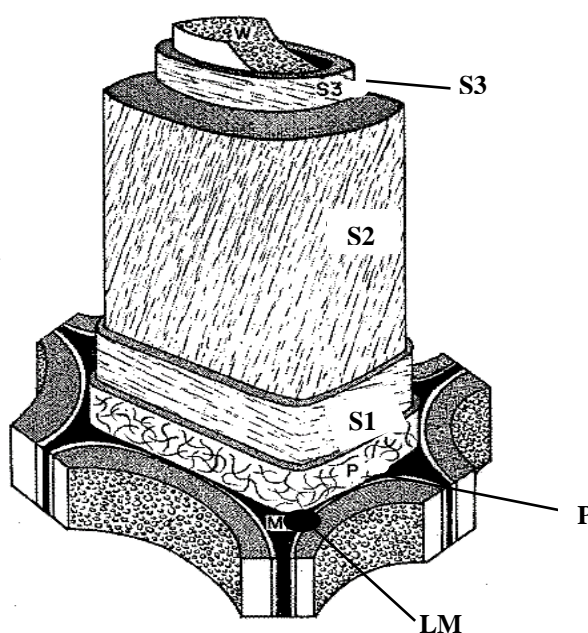


Figura 11. Esquema simplificado de la pared células de las fibras vegetales. Imagen adaptada de Sjöström (1993).

A medida que la célula envejece y se diferencia, se forma la pared secundaria, formada por tres capas; la capa exterior (S1), capa media (S2) y capa interior (S3), y cuyos constituyentes van a depender del tipo de célula y tejido al cual pertenecen. La capa S1 se encuentra inmediatamente adyacente a P, orientada en dirección perpendicular al eje de la fibra. La capa S2 ocupa la mayor parte del volumen de la pared celular, y en ella la orientación de las fibrillas es prácticamente paralela al eje de la fibra. En S3, las fibrillas forman una hélice plana en dirección transversal (Sjöström, 1993).

Tanto la distribución de los componentes mayoritarios de la BLC dentro de la célula vegetal, como la orientación de las fibrillas en las distintas secciones de la pared celular tienen un efecto muy relevante sobre las condiciones de producción y la calidad de las pastas de celulosa.

3.2. Residuos lignocelulósicos

La BLC, proveniente de residuos de la agricultura y de la silvicultura, así como de sus industrias, atraen cada vez más la atención como materia prima renovable, abundante, disponible y económica para la producción sostenible de productos químicos, materiales y biocombustibles (Nanda et al., 2015). Son por tanto una alternativa a las materias primas de las biorrefinerías 1G, que utilizan cultivos como la caña de azúcar, los cereales, las oleaginosas, etc. todos ellos abundantes pero que compiten con la agricultura por la producción de alimentos. Por otra parte, los residuos de cultivos, definidos como las partes no comestibles de las plantas, que se dejan en el campo después de la cosecha e incluyen los restos que se generan en la recolección de alimentos y durante el procesado de estos (Lal, 2005), representan más de la mitad de la biomasa agrícola del mundo (Lozano and Lozano, 2017).

Una bio-economía orientada hacia la sostenibilidad, donde el uso de los residuos de la biomasa reemplaza a las materias primas fósiles, puede cumplir requisitos ambientales, sociales y económicos para un desarrollo sostenible. Además, esta alternativa apoya los objetivos geoestratégicos de la Unión Europea (UE) debido a que, al sustituir el petróleo por residuos, reduce la dependencia hacia los países exportadores de petróleo e intensifica la utilización de recursos propios (Thorenz et al., 2018). Por ejemplo, en 2016 la

producción de cereales en la UE ascendió a 301 MMton, lo que supone un 20 % de la producción mundial de trigo, un 7 % de la de maíz y un 41 % de la de cebada. Además, se pueden extraer cantidades significativas de residuos (31 MMton) de la producción de maíz en grano, por lo que se cuenta con grandes cantidades de residuos de posible uso en biorrefinerías, solo de los cereales (Bais-Moleman et al., 2019; Thorenz et al., 2018). La situación actual es que los residuos de las cosechas de cereales aportan muy poco valor nutricional (alimentación animal) o suponen un problema que, tradicionalmente, se resuelve mediante quema, aumentando el riesgo de incendios, el aporte de CO₂ a la atmósfera y desaprovechar la energía y materiales contenida en los mismos (Scarlat et al., 2019).

Un problema asociado a las biorrefinerías 2G, es la baja densidad de los residuos lignocelulósicos y, en muchos casos, su alto contenido de humedad. Esto se traduce en un alto coste de transporte, que hace que solo se plantee valorizar los residuos existentes en un radio de 80-100 Km alrededor de la biorrefinería. Como consecuencia, el tamaño de una biorrefinería no es excesivamente grande, de 30.000 a 50.000 ton/año, con lo cual se desaprovechan las ventajas que tiene el factor de escala para rebajar costes. Por lo tanto, se hace imprescindible diversificar al máximo las materias primas para la producción de azúcares y lignina dentro de un esquema de biorrefinería 2G. Con ese objetivo, en la realización de esta Tesis Doctoral se han considerado tres residuos lignocelulósicos como materia prima; paja de trigo (PT), tallos de *Cynara Cardunculus L.* (cardo) y rastrojo de maíz (RM), debido a su disponibilidad y facilidad de recolección.

3.2.1. Paja de trigo

El trigo es uno de los principales productos agrícolas a nivel mundial y es considerado el cultivo de alimentos más prolífico y de mayor distribución. En la actualidad, la suma global del área plantada de trigo es de más de 2,2 MMha, con una producción de granos de trigo de 730 MMton/año, lo que representa una tercera parte de la producción mundial de alimentos (Fang and Shen, 2018). En 2017, más de 6 MMha se cultivaron con cereales en España, de los cuales un tercio están asociados con el trigo; siendo Castilla y León la principal comunidad autónoma productora de este cereal (ESYRCE, 2018).

La PT corresponde al tallo que queda después de cosechar los granos de trigo. Kim and Dale, (2004) han determinado que se producen 1,3 Kg de paja por cada Kg de grano de trigo, aunque este rendimiento depende de su variedad y de las condiciones climáticas. Se considera un buen material para producir fibra de celulosa y, en España fue utilizada como materia prima para producir pasta semiquímica para fabricar la onda del cartón ondulado. La PT y de otros cereales se produce en grandes cantidades en todo el mundo, con un ciclo de crecimiento anual, mucho más corto que el de la madera, aunque concentrado en una estación del año (Fang and Shen, 2018). Es pues una materia prima abundante, barata y de fácil disponibilidad, que además tiene un alto contenido en celulosa, por lo que es una opción prometedora dentro del concepto de biorrefinería. Por estas razones se ha elegido como materia prima de referencia en este trabajo de Tesis.

3.2.2. Rastrojo de maíz

El maíz es el principal producto agrícola a nivel mundial, con una producción estimada de $1,06 \cdot 10^9$ ton/año (FAO, 2019). El RM, es el residuo del cultivo del maíz, que incluye tallos, hojas y el resto de las mazorcas una vez extraído el grano (Karimi Alavijeh and Karimi, 2019). Se produce en una proporción de aproximadamente 1 Kg/Kg de grano de maíz (Kim and Dale, 2004) y está compuesto principalmente por polisacáridos (celulosa y hemicelulosas), por lo que tiene un gran potencial para su uso en biorrefinerías 2G (Karimi Alavijeh and Karimi, 2019; Méndez-Hernández et al., 2018), principalmente en Estados Unidos (Méndez-Hernández et al., 2018), donde se produce aproximadamente el 36 % del total de maíz en el mundo (FAO, 2019) y que además, es uno de los mayores emisores de CO₂ a nivel mundial (14 %) (Karimi Alavijeh and Karimi, 2019).

Por lo tanto, debido a la importancia de este cultivo, a su extensión por todas las regiones del mundo y a la abundancia, se ha elegido el RM como materia prima objeto de estudio en esta Tesis Doctoral, para su adecuación a un esquema de biorrefinería integrada.

3.2.3. Plantas de escaso valor alimentario: *Cynara Cardunculus L.*

Cynara Cardunculus L., comúnmente conocido como cardo, es una planta perenne con ciclos de desarrollo anuales, que crece naturalmente en hábitats hostiles, debido a su gran adaptación a ecosistemas con estrés hídrico, grandes variaciones de temperatura y suelos pedregosos e improductivos, comunes en los países Mediterráneos (Abbate and Patanè, 1996; Curt et al., 2002; Gominho et al., 2018, 2001). Después de la recolección, la biomasa tiene una baja humedad, lo que elimina una de las desventajas de la utilización industrial de biomasa agrícola, donde los altos contenidos de humedad afectan el transporte, el almacenamiento y la conservación (Gominho et al., 2001; Oliet et al., 2005). En estudios para su aprovechamiento se ha probado como materia prima para diferentes aplicaciones industriales, como por ejemplo en la producción de combustible sólido, aceite a partir de sus semillas, biodiesel, pasta de papel, forraje verde y compuestos farmacológicamente activos, por mencionar algunos (Fernández et al., 2006).

La alta productividad de la biomasa (14-20 ton/Ha año) y su composición química hacen del cardo una materia prima muy atractiva para los esquemas de biorrefinería lignocelulósica, donde podría aprovecharse principalmente tanto la celulosa como las hemicelulosas, constituidas casi exclusivamente por heteropolisacáridos de tipo xilano, fácilmente hidrolizables a xilosa (Fernández, 1998; Shatalov and Pereira, 2011). No obstante, el principal motivo por el que se ha incluido el cardo en este estudio es por su buena adaptación a terrenos baldíos. Lo que supondría que, en el caso de construirse una biorrefinería basada en una determinada BLC, las posibilidades de aumentar su producción sumando el cardo como materia prima son grandes, incluso en el caso de que no se cuente con terreno fértil en las inmediaciones de la instalación.

4. PRE-TRATAMIENTOS

La naturaleza recalcitrante de la BLC, causada por su composición y estructura, hace que sea difícil de hidrolizar. Las cadenas de celulosa, organizadas en microfibrillas elementales, forman áreas cristalinas difíciles de penetrar, alternadas con regiones amorfas, más accesibles. Estas unidades están, a su vez, inmersas en una matriz de

hemicelulosas y lignina que supone una barrera adicional para el ataque de reactivos químicos. Además, a nivel celular, la fibra de celulosa está rodeada de la LM, una región con alto contenido en lignina y que, como cementante, mantiene unidas las fibras de celulosa. De esta forma, el conjunto de barreras que se han descrito hace de la BLC no solo un material de excelente resistencia mecánica, sino también muy duradero y resistente a agentes externos.

Las características previamente descritas, provocan una fuerte resistencia a la hidrólisis de los polisacáridos estructurales, necesaria para su uso en biorrefinerías 2G. Por lo tanto, obligatoriamente, se va a requerir una etapa de pre-tratamiento para de esta forma, fraccionar la BLC en una corriente rica en hemicelulosas y lignina, y en un residuo sólido concentrado en celulosa, así como también, favorecer la digestibilidad enzimática de los polisacáridos y maximizar la valorización de la biomasa original (Hendriks and Zeeman, 2009; Nakagame et al., 2010).

Como consecuencia del pre-tratamiento, la lignina y las hemicelulosas hidrolizadas son disueltas y retiradas en el licor residual, se abre la estructura de la BLC y las enzimas hidrolíticas tienen un mayor acceso a los polisacáridos estructurales de la BLC (Figura 12). A su vez se reduce la cristalinidad de la celulosa y se aumenta la porosidad del material lo que, en conjunto, también favorece la acción de las enzimas (Sun and Cheng, 2002; Zhao et al., 2009).

La etapa de pre-tratamiento puede resultar la más cara dentro de las operaciones de procesamiento, representando al menos el 20 % de los costes totales de producción (Yang and Wyman, 2008). Además, tiene un impacto generalizado en el coste de prácticamente todas las demás etapas, como por ejemplo, en la reducción del tamaño de partícula del material, en el manejo de las corrientes líquidas, en el procesamiento de los sólidos obtenidos, en la potencial producción de co-productos, en la toxicidad, en la fermentación, en la sacarificación enzimática y, por tanto, en la cantidad necesaria de enzimas (Menon and Rao, 2012; Zhao et al., 2009).

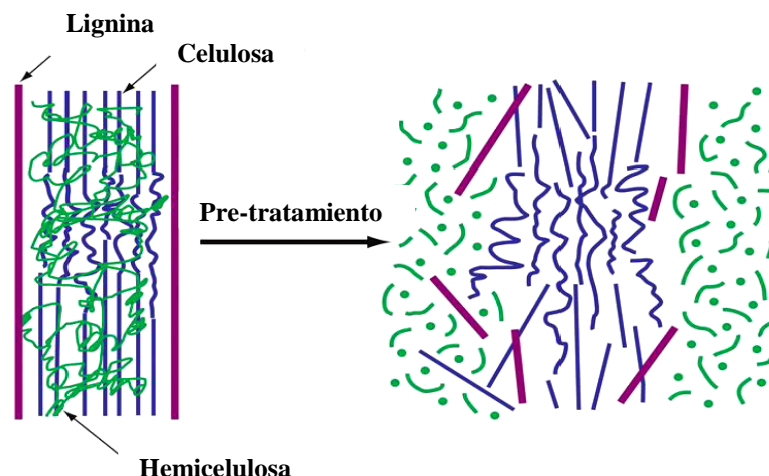


Figura 12. Esquema del efecto del pre-tratamiento en la biomasa lignocelulósica. Imagen adaptada de Mosier et al. (2005).

4.1. Tipos de pre-tratamientos

Existen distintos tipos de pre-tratamientos, los que pueden ser aplicados individualmente o en combinación, y que se clasifican en cuatro grupos principales, atendiendo al tipo de cambio que provocan en la BLC (Behera et al., 2014):

- **Físicos:** Se utilizan para aumentar el área de superficie accesible y el tamaño de los poros, para disminuir la cristalinidad y el grado de polimerización de la celulosa presente en la BLC. Ejemplos: molienda (bolas, rodillos, martillo), astillado, trituración, pirólisis, molienda vibro-energética, radiación (γ y haz de electrones).
- **Químicos:** Se han convertido en uno de los métodos más prometedores para mejorar la biodegradabilidad de la celulosa mediante la eliminación de lignina y/o hemicelulosas y para disminuir el grado de polimerización y la cristalinidad de la celulosa. Ejemplos: tratamiento con agentes oxidantes, álcalis, ácidos orgánicos (oxálico, acetilsalicílico y salicílico), ácidos inorgánicos (HCl o H_2SO_4), sales.

- **Físico-químicos:** Combinan procesos químicos y físicos para disolver las hemicelulosas y alterar la estructura de la lignina, proporcionando una mejor accesibilidad enzimática de la celulosa. Su eficacia depende de las condiciones del proceso y del disolvente utilizado. Ejemplos: explosión con vapor, extracción con agua caliente, expansión de fibras con amoníaco (AFEX, “ammonia fiber explosion”).
- **Biológicos:** Se utilizan hongos capaces de producir enzimas que degradan lignina, hemicelulosas y polifenoles presentes en la biomasa. Sus ventajas son la especificidad de la reacción y del sustrato, los bajos requerimientos de energía, la ausencia de compuestos tóxicos y el alto rendimiento de los productos deseados. Sin embargo, es un proceso lento y requiere un control cuidadoso de las condiciones de proceso. Ejemplos: hongos de pudrición blanca, parda o blanda.

No existe un consenso sobre cuál es el mejor pre-tratamiento, debido a que se deben considerar las características de la materia prima, como las proporciones relativas de celulosa, hemicelulosa y lignina, así como la capacidad de producción y los tipos de productos deseados. Sin embargo, se han establecido condiciones ideales que todos los pre-tratamientos deberían cumplir (Romaní et al., 2010):

- Funcionamiento simple y económico.
- Limitados requerimientos de energía, agua y productos químicos.
- Limitada corrosión de reactores.
- Capacidad de alterar la estructura de la BLC.
- Selectividad para evitar las pérdidas de polisacáridos.
- Alta recuperación de productos derivados de hemicelulosas.
- Limitada producción de productos de degradación no deseados e inhibidores.
- Producción de sustratos con alto contenido de celulosa y alta susceptibilidad enzimática.
- Generación de lignina de alta calidad o productos derivados de la lignina.
- Generación limitada de residuos.

Con estas consideraciones se observa que los pre-tratamientos físicos son, en muchas ocasiones, complementarios a otros tipos de tratamientos, debido a que no son eficaces en obtener fracciones ricas en azúcares libres. Los pre-tratamientos químicos resultan eficaces para fraccionar la BLC y obtener un sólido celulósico hidrolizable a azúcares y un líquido residual con los productos de hidrólisis de hemicelulosas y lignina; aunque presentan los siguientes inconvenientes: el coste de algunos productos (álcalis, ácidos orgánicos), la limitación a algunos tipos de BLC, como el tratamiento ácido no aplicable a maderas coníferas o la generación de inhibidores de etapas posteriores (como la fermentación). No obstante, el pre-tratamiento con ácidos inorgánicos diluidos es uno de los más utilizados. Los pre-tratamientos físico-químicos son bastante económicos y dan un resultado aceptable con la BLC procedente de plantas herbáceas o de maderas frondosas. El pre-tratamiento AFEX consigue un buen fraccionamiento pero es costoso. Por último, los procesos microbianos tienen el serio inconveniente de la lentitud de la degradación y de requerir un control exhaustivo del proceso.

4.1.1. Hidrólisis con ácido sulfúrico diluido

El uso de ácidos inorgánicos en la etapa de pre-tratamiento ha sido probado ampliamente para mejorar la digestibilidad enzimática de la BLC y es el método más utilizado en la industria. Se ha recurrido tanto a disoluciones con ácido concentrado como a disoluciones diluidas. En el primer caso, se utiliza una alta concentración de ácido (habitualmente H_2SO_4) a temperatura ambiente, lo que permite obtener un alto rendimiento de azúcares con la ventaja de no utilizar enzimas para la sacarificación. Sin embargo, este proceso tiene inconvenientes que incluyen un alto consumo de ácido, la corrosión del equipo y un tiempo de reacción prolongado, así como la obligación de recuperar el ácido después del pre-tratamiento (Sun and Cheng, 2002).

La hidrólisis con ácido diluido utiliza bajas concentraciones de ácido (0,5-1 %) y altas temperaturas de reacción para lograr, tras el tratamiento enzimático del substrato sólido, tasas aceptables de conversión de celulosa a glucosa. Es un pre-tratamiento eficaz para una amplia gama de BLC, incluyendo residuos agrícolas, maderas frondosas y residuos sólidos municipales; sin embargo, no es tan eficaz en el pre-tratamiento de maderas

coníferas (Alvira et al., 2010; Balat, 2011; Jönsson and Martín, 2016). Este tratamiento provoca la hidrólisis y eliminación de las hemicelulosas, dando como resultado una alta recuperación de estas en el efluente líquido obtenido, compuesto principalmente por xilosa, arabinosa, glucosa, galactosa y manosa. Además, las altas temperaturas aceleran la velocidad de descomposición de los azúcares, principalmente de las pentosas, generándose compuestos de degradación como los compuestos furanos, los compuestos fenólicos y los ácidos débiles (Sección 4.3). Algunas de estas especies químicas inhiben etapas posteriores como la sacarificación enzimática de la celulosa, por lo que se podrían requerir operaciones adicionales, como la detoxificación y el lavado para su eliminación, aumentando el coste de producción (Mathew et al., 2016; Talebnia et al., 2010). Por otro lado, no se lleva a cabo una deslignificación significativa de la BLC, pero se produce una redistribución de la lignina y un aumento del tamaño/volumen de los poros de la pared celular del material, por lo que se obtiene un residuo sólido con una convertibilidad enzimática mejorada (Chandel et al., 2012; Ravindran and Jaiswal, 2016; Yang and Wyman, 2008). No obstante, la lignina, alterada químicamente con el pre-tratamiento ácido, inhibe la sacarificación enzimática del substrato celulósico al retener las celulasas que han de interactuar con la celulosa y dejar, por tanto, una menor concentración de enzimas activas en el medio.

Varios ácidos inorgánicos diluidos (H_2SO_4 , HCl , H_3PO_4 y HNO_3) han sido utilizados en el pre-tratamiento de diferentes materiales lignocelulósicos (Alvira et al., 2010). Sin embargo, el H_2SO_4 diluido (DSA, “diluted sulfuric acid”) ha sido el más utilizado en el pre-tratamiento de residuos agrícolas, y ha sido objeto de investigación y desarrollo durante más de dos décadas en la producción de combustibles (Yang and Wyman, 2008), así como también para la producción comercial de furfural (Mosier et al., 2005). Se realiza, generalmente, a temperaturas de entre 100 a 200 °C, con una concentración de H_2SO_4 de 0,5 a 2,5 % (Sun et al., 2016). Entre sus limitaciones se puede citar que el H_2SO_4 , al ser muy corrosivo, exige materiales de construcción de los equipos particulares y caros; además, puede ocurrir la formación de productos de degradación de los componentes de la BLC, con el posible daño del equipo utilizado, aumentando los costes de la etapa de pre-tratamiento (Alvira et al., 2010; Mosier et al., 2005; Yang and Wyman, 2008).

La elección de las condiciones de operación, tales como tiempo, temperatura, concentración de ácido, relación líquido/sólido (L/S), tipo de reactor empleado y tipo de biomasa, es de suma importancia para la obtención de una recuperación óptima de los azúcares y una mínima degradación de los mismos, y de esta forma garantizar el éxito del proceso (Sindhu et al., 2011).

4.1.2. Pre-tratamiento con disolventes

La biorrefinería lignocelulósica pretende hacer un uso eficiente de los recursos disponibles y rentabilizar al máximo todos los componentes de la biomasa. Para este objetivo, el empleo de disolventes orgánicos solubles en agua para deslignificar la BLC es conocido y ha sido propuesto en la industria de la celulosa como alternativa a los procesos clásicos (Kraft y sulfito), debido a que produce tres fracciones separadas: lignina, una corriente acuosa de hemicelulosas y una fracción de celulosa relativamente pura (Zhao et al., 2009). Concretamente, estos tratamientos han sido utilizados para la producción de lignina y otros co-productos con valor añadido, como por ejemplo acetona, butanol, etanol y biogás (Salapa et al., 2017).

Se han utilizado un gran número de solventes orgánicos, puros o en mezcla con agua, dentro de los que se incluyen aquellos con bajo punto de ebullición, como el metanol y el etanol, así como también alcoholes con puntos de ebullición más altos, como etilenglicol, glicerol, alcohol tetrahydro-furfurílico, y otras clases de compuestos orgánicos, como por ejemplo dimetilsulfóxido, éteres, cetona y fenoles (Zhao et al., 2009). La temperatura de reacción varía entre 100 y 250 °C, siendo 200 °C la más utilizada. Sin embargo, si se agregan catalizadores ácidos al medio de reacción, el proceso puede realizarse a menor temperatura, debido a que provocan un aumento de la velocidad de deslignificación y de la hidrólisis de la fracción de hemicelulosas. Entre los catalizadores ácidos utilizados están los ácidos minerales (HCl, H₂SO₄ y H₃PO₄) y los ácidos orgánicos (CH₂O₂, C₂H₂O₄, C₇H₆O₃, C₉H₈O₄) (Jönsson and Martín, 2016; Sun and Cheng, 2002). El H₂SO₄ es el catalizador más utilizado, habitualmente en una concentración que va de 0,5 a 1,75 % (en base seca) y ha sido aplicado a varios tipos de BLC (pino, álamo híbrido, miscanthus,

“switchgrass”, palma aceitera), lográndose altos rendimientos en la producción enzimática de glucosa (Brosse et al., 2017).

A nivel industrial, la deslignificación con mezclas de disolvente-agua solo tuvo un éxito parcial, construyéndose instalaciones piloto de tamaño moderado para los procesos denominados Alcell® (en base a etanol) (Ni and Hu, 1995) y ASAM (“alkaline sulphite anthraquinone-methanol process”) (Sridach, 2010), debido al inconveniente de requerir elevadas presiones y al coste de la recuperación del disolvente, lo que hace muy difícil competir con el proceso Kraft, que aprovecha el factor de escala para construir fábricas de más de 1 MMton/año de celulosa.

En el caso de las biorrefinerías basadas en residuos lignocelulósicos, las capacidades de producción son menores, como se ha comentado anteriormente. Además, en el caso de deslignificar BLC con mezclas de disolvente-agua, no se requieren condiciones de reacción tan severas como las requeridas para madera de eucalipto, sino un ligero pre-tratamiento que modifique la BLC, lo suficiente para aumentar la accesibilidad enzimática de la celulosa. Por ello, el pre-tratamiento de BLC con mezclas de disolvente orgánico-agua se contempla como una posibilidad interesante para la obtención de fracciones de: lignina (precipitado), hemicelulosas (disolución acuosa) y una celulosa bastante pura (substrato sólido) (Zhao et al., 2009).

Una de las desventajas de este tipo de pre-tratamiento es el hecho de que los sólidos pre-tratados obtenidos deben ser lavados para evitar la precipitación de la lignina disuelta, eliminar los restos de solvente y los posibles compuestos de degradación generados, y de esta forma, evitar problemas de inhibición en etapas posteriores del proceso. Esto genera un mayor gasto de agua y una corriente adicional a tratar. Además, los disolventes deben ser recuperados para abaratar los costes de operación (Jönsson and Martín, 2016; Salapa et al., 2017).

Debido al bajo coste y a su facilidad de recuperación, el metanol y el etanol son los alcoholes más empleados (Zhao et al., 2009), aunque el etanol es el disolvente orgánico más usado en los últimos años debido a que no presenta los problemas de toxicidad del metanol (Salapa et al., 2017).

4.1.2.1. Pre-tratamiento con etanol

El uso de etanol para pre-tratar madera se remonta a finales del siglo XIX, cuando se utilizó con el propósito de estudiar los componentes de la madera (Zhao et al., 2009). No fue hasta la década de 1980, cuando se desarrollan el proceso “Organosolv”, donde se plantea la alternativa de producir pasta de celulosa utilizando un solvente de bajo punto de ebullición para sustituir la fabricación de pastas Kraft y pastas al sulfito (Brosse et al., 2017).

A pesar de que el proceso “Organosolv” no logra sustituir los procesos tradicionales de producción de pasta de celulosa, con la llegada de las biorrefinerías lignocelulósicas y la necesidad de pre-tratar la BLC, los pre-tratamientos con mezclas de disolvente-agua, y en particular etanol-agua (EW, “ethanol-water”), forman parte de las estrategias desarrolladas actualmente a escala industrial para la producción de biocombustibles y biomateriales (Brosse et al., 2017). Una de las ventajas de utilizar etanol es su completa miscibilidad con agua, su fácil recuperación mediante destilación simple con bajo requerimiento de energía, su baja toxicidad y su precio (Zhao et al., 2009).

Los pre-tratamientos que utilizan solventes orgánicos, permiten extraer buena parte de la lignina y de las hemicelulosas de la BLC, además de provocar el aumento del área de la superficie accesible y del volumen de los poros, con la consiguiente mejora de la digestibilidad enzimática. El poder deslignificante ha sido explicado por la teoría del parámetro de solubilidad de Hildebrand (δ), que predice que una sustancia se disolverá en un disolvente (o mezclas de disolventes) que tengan valores de δ similares (Hildebrand and Scott, 1950). El valor de δ para la lignina está en torno a $14 \text{ cal}^{1/2}/\text{cm}^{-3/4}$, lo que es solo una referencia, debido a que los fragmentos de lignina con diferente peso molecular y grupos funcionales muestran diferencias significativas en sus parámetros de solubilidad, mientras que el etanol y el agua tienen valores de 12,08 y 22,41 ($\text{cal}^{1/2}/\text{cm}^{3/4}$), respectivamente. En consecuencia, la eliminación de lignina no es homogénea y, para una composición dada del licor, se eliminan diferentes tipos de lignina según el peso molecular y los sustituyentes.

Se han identificado cuatro reacciones principales durante el pre-tratamiento de la BLC con etanol (Brosse et al., 2017):

- 1) Hidrólisis de los enlaces internos en ligninas, así como enlaces de lignina-hemicelulosa (éter y enlaces éster del ácido 4-O-metilglucurónico a los carbonos α de las unidades de lignina).
- 2) Hidrólisis de los enlaces glicosídicos en hemicelulosas y, en menor medida, en celulosa, según severidad del proceso.
- 3) Degradación catalizada por ácido de los monosacáridos en furfural, hidroximetilfurfural (HMF) y otros productos de degradación, seguida de reacciones de condensación entre la lignina y estos aldehídos reactivos.
- 4) Escisión de los enlaces éter, principal causa de la descomposición de la lignina. En sistemas ácidos, se favorece la hidrólisis de los enlaces α -éter, pero es probable que los enlaces β -aril éter también se rompan bajo determinadas condiciones.

El creciente interés en la comercialización de la lignina, se debe a la aparición de nuevas biorrefinerías que centran su producción en productos biológicos a partir de materias primas lignocelulósicas (Ragauskas et al., 2014). Las proyecciones sugieren que las biorrefinerías 2G pueden generar más de 65 MMton/año de lignina, cifra superior a la producida por la industria de la celulosa y el papel. La mayor parte de la lignina se utiliza como combustible de bajo nivel para la fabricación de pasta, mientras que solo el 1-2 % se utiliza en aplicaciones con alto valor añadido. Por ello, es importante desarrollar nuevos procesos para la recuperación y modificación de la lignina derivada de los procesos de fabricación de papel y de los procesos de biorrefinería, para producir lignina con propiedades químicas y físicas adecuadas para una utilización de alto valor añadido (Gordobil et al., 2016).

Los procesos de deslignificación tienen una gran influencia en la estructura y propiedades de la lignina obtenida (Vishtal and Kraslawski, 2011). Así, por ejemplo, las ligninas Kraft contienen azufre (1-2 %), un gran número de estructuras condensadas y un alto porcentaje

de grupos hidroxilo fenólicos, lo que hace difícil su valorización y su destino es ser quemadas para su aprovechamiento energético en la fábrica de pasta. Por otro lado, las ligninas obtenidas con disolventes orgánicos, difieren significativamente de otras ligninas técnicas. Estructuralmente, no tienen azufre, tienen una mayor cantidad relativa de grupos hidroxilo fenólicos, una estructura más oxidada y son fáciles de procesar térmicamente, lo que representa una ventaja respecto a otras ligninas industriales, y presentan aplicaciones para materiales compuestos (Kubo and Kadla, 2004).

Entre los productos que se podrían desarrollar a partir de lignina obtenida mediante el pre-tratamiento de BLC con mezclas disolvente-agua se encuentran: fibras de carbono, plásticos, termoplásticos, espumas, membranas poliméricas, combustibles y productos químicos que actualmente se producen a partir de petróleo. Estudios recientes sobre su potencial antioxidante podrían llevar a aplicaciones más amplias, como la producción de agentes antimicrobianos, anti-envejecimiento e inhibidores de la corrosión (Hussin et al., 2015b, 2015a). Sin embargo, todavía se requiere la modificación adecuada de las estructuras de este tipo de ligninas para aumentar su aplicabilidad (Brosse et al., 2017).

Para rentabilizar una biorrefinería lignocelulósica, además del uso completo de todos los componentes, incluida la lignina, hay que conseguir un pre-tratamiento sostenible. Si bien los procesos basados en mezclas de disolvente-agua, como el sistema EW, producen una lignina de mayor calidad que la obtenida con pre-tratamientos como la hidrólisis ácida, el problema que se mantiene, e incluso se agrava, es la necesidad de recuperar el disolvente para hacerlo económicamente rentable, pues esta fase del pre-tratamiento se ha identificado como la más crítica. Todo ello obliga a estrategias de recuperación efectivas del disolvente (Zhang et al., 2016). No obstante, una alternativa no explorada y que podría abaratar considerablemente los costes de la recuperación del disolvente es la de reutilizar la mezcla EW, y contrastar sus resultados con los que se obtiene con licor fresco.

4.2. Gasto energético según el pre-tratamiento

Se ha hecho énfasis en la importancia del coste energético en una biorrefinería lignocelulósica. Pocos trabajos han comparado los resultados de invertir diferentes cantidades de energía en el pre-tratamiento y analizar qué nivel mínimo garantiza obtener un sólido rico en celulosa y, a la vez, fácilmente hidrolizable a azúcares fermentables. El problema del gasto energético es aún más relevante cuando el pre-tratamiento se hace con mezclas EW, donde hay una etapa de recuperación del etanol mediante destilación. El aumento excesivo de la temperatura o de la duración del pre-tratamiento puede disminuir el rendimiento en celulosa, causar un alto consumo de energía y dar lugar a la formación de compuestos de degradación que afectan negativamente a la etapa posterior de digestibilidad enzimática. Por tanto, se hace necesario incluir un factor que mida la energía involucrada en el pre-tratamiento y que permita identificar las condiciones de reacción más favorables para producir un sustrato rico en celulosa, con una alta digestibilidad enzimática.

Para ello, y puesto que esta energía va a depender tanto de la temperatura alcanzada, como del tiempo del pre-tratamiento, en esta Tesis Doctoral se ha optado por considerar el factor H (índice que mide la intensidad del tratamiento en el proceso Kraft) que integra la temperatura y el tiempo de reacción en una sola variable. El factor H se va a utilizar para comparar el gasto energético asociado al pre-tratamiento y se define por la ecuación 1 (Vroom, 1957).

$$H = \int_0^t e^{\left(43.2 - \frac{16115}{T}\right)} dt \quad (1)$$

Donde, T es temperatura (K) y t es el tiempo de pre-tratamiento (h).

4.3. Compuestos de degradación

Al pre-tratar la BLC, para eliminar las hemicelulosas y la lignina, y lograr una buena digestibilidad enzimática de la celulosa, se generan productos de degradación de sus componentes estructurales principales, los cuales pueden tener un efecto negativo en la

etapa de sacarificación enzimática y/o posterior fermentación (Figura 13). La cantidad producida y la naturaleza va a depender del tipo de BLC y de las condiciones de pre-tratamiento: tiempo, pH, temperatura, entre otros (Klinke et al., 2004).

Los compuestos de degradación pueden ser clasificados de acuerdo a su estructura química en derivados furanos, ácidos débiles y compuestos fenólicos (Almeida et al., 2007), los que son descritos a continuación:

4.3.1. Derivados furanos

En este grupo se encuentra el HMF y el furfural, formados a partir de la deshidratación en condiciones ácidas de las hexosas y pentosas, respectivamente. Bajo condiciones de anaerobiosis, la mayoría de los microorganismos utilizados para la fermentación de azúcares son capaces de reducir estos compuestos a sus alcoholes correspondientes, de menor toxicidad. Sin embargo, altas concentraciones pueden tener un claro efecto inhibitorio en la fermentación, debido a que afectan a las enzimas glicolíticas, provocando una prolongación de la fase “lag” de crecimiento de la biomasa y una disminución de la productividad (Almeida et al., 2007).

4.3.2. Ácidos débiles

El ácido acético se genera por la hidrólisis de los grupos acetilo asociados a las hemicelulosas (Palmqvist, 1998); el ácido fórmico y levulínico se forman por la degradación de HMF, además, el ácido fórmico puede ser producido por la degradación de furfural en condiciones ácidas y altas temperaturas. Estos compuestos provocan una reducción en la producción de biomasa y en los rendimientos de producción de etanol. La forma no disociada de estos ácidos atraviesa la membrana plasmática de las células, lo que provoca la disminución del pH intracelular que debe ser compensado por una enzima ATPasa de membrana que realiza un bombeo de H^+ hacia el exterior con gasto de energía. Cuando las concentraciones de ácidos en forma no disociada son elevadas, se supera la capacidad de eliminar protones y se provoca la acidificación del citoplasmas y la muerte

celular (Almeida et al., 2007). Otros estudios han demostrado que tienen pocos efectos inhibitorios sobre las celulasas (Kim et al., 2011).

4.3.3. Compuestos fenólicos

Estos compuestos se generan debido a la ruptura de los enlaces éter β -O-4 y otros enlaces ácido-lábiles de la lignina. Se encuentran en menor concentración que los derivados furanos y ácidos, debido a su menor solubilidad, aunque su concentración aumenta con la severidad del pre-tratamiento (Pienkos and Zhang, 2009). Los más comunes son: ácido 4-hidroxibenzoico, 4-hidroxibenzaldehído, vainillina, alcohol dihidroconiferílico, aldehído de coniferilo, siringaldehído, ácido sirínico y cetonas de Hibbert (Jönsson and Martín, 2016). Este tipo de compuestos inhibidores provocan la pérdida de la integridad de la membrana plasmática de las células, por lo que se pierde su función de membrana selectiva y matriz enzimática (Almeida et al., 2007), reduciendo el crecimiento celular y el consumo de azúcares (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000). Por otro lado, debido a que una fracción de los extractivos son compuestos fenólicos, es probable que algunos fenoles solubles permanezcan en los hidrolizados, como por ejemplo los ácidos pirogálico y gálico, causando desactivación e inhibición de las enzimas β -glucosidasas (Kim et al., 2013).

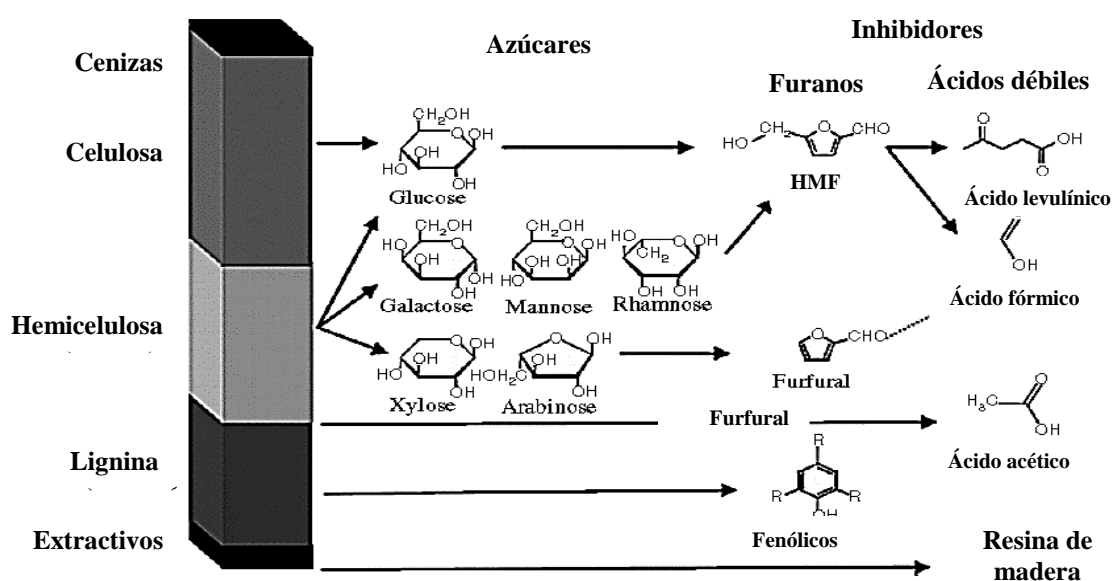


Figura 13. Principales productos de degradación generados durante la etapa de pre-tratamiento de la biomasa lignocelulósica. Imagen adaptada de Almeida et al. (2007).

Los compuestos de degradación pueden ser eliminados lavando los materiales pre-tratados o utilizando mecanismos de detoxificación o acondicionamiento. Esta estrategia incluye técnicas como el uso de aditivos químicos, agentes reductores, polímeros, extracción líquido-líquido y extracción líquido-sólido. Sin embargo, un inconveniente de los métodos de desintoxicación es que se requiere una etapa de proceso adicional (Jönsson and Martín, 2016).

5. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Después de la etapa de pre-tratamiento, la BLC debe ser hidrolizada para despolimerizar y liberar los azúcares monoméricos potencialmente aprovechables dentro del concepto de biorrefinería. De esta forma, la hidrólisis enzimática (HE), es considerada la etapa crucial en la bioconversión de biomasa a combustibles líquidos y productos químicos, dentro de los enfoques de "plataforma bioquímica" o "plataforma de azúcar" (Stickel et al., 2014). Esta etapa se lleva a cabo mediante una mezcla compleja de enzimas celulolíticas denominadas celulasas, producidas principalmente por plantas, hongos y bacterias, y también por algunos protozoos, moluscos y nematodos. Actualmente, las fuentes microbianas comunes de obtención de celulasas para la producción a escala industrial, son los hongos que crecen en el rango de temperatura de 30–35 °C (mesófilos), como *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger*. Sin embargo, dependiendo del producto deseado, se puede seleccionar un productor microbiano apropiado de una amplia gama disponible en la naturaleza (Biswas, 2014).

El complejo enzimático celulasa está compuesto por 3 tipos de enzimas pertenecientes a la clase EC 3.2.1X, las que actúan sinérgicamente (Figura 14) debido a que cada una de ellas crea sustratos para las otras o elimina oligosacáridos y disacáridos que son inhibidores de otras celulasas (Saini et al., 2015):

- 1) **Endoglucanasas** (EC 3.2.1.4, endo- β -1,4-glucanasa o endo-1,4- β -D-glucan-4-glucanohidrolasa): hidrolizan enlaces β -1,4-glucosídicos internos de las regiones amorfas de la celulosa, disminuyendo el grado de polimerización y acortando las

cadenas de celulosa, generando de esta forma extremos reductores y no reductores (Wood and McCrae, 1979).

- 2) **Exo- β -(1,4)-glucanasa** (o 1,4- β -D-glucano celobiohidrolasas, EC 3.2.1.91): escinden unidades de celobiosa de los extremos no reductores de las moléculas de celulosa.

Exo- β -(1,4)-glucosidasa (o 1,4- β -D-glucanohidrolasas, EC 3.2.1.74): escinden sucesivamente unidades de glucosa del extremo no reductor del glucano.

- 3) **β -glucosidasa** (o β -D-glucósido glucohidrolasa, EC 3.2.1.21): Hidroliza la celobiosa y otros β -1,4-oligoglucósidos de cadena muy corta para formar glucosa. A diferencia de las exoglucosidasas, la velocidad de hidrólisis de la celobiosa disminuye notablemente a medida que aumenta el grado de polimerización del sustrato (Saini et al., 2015).

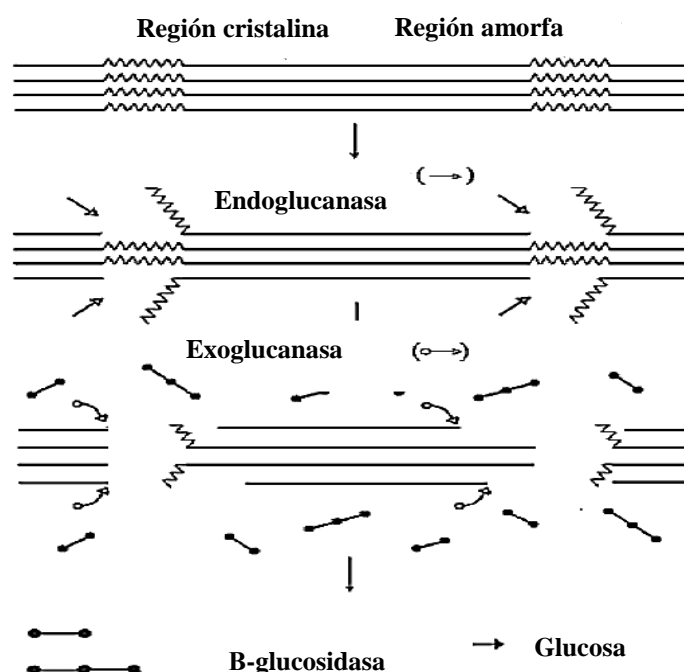


Figura 14: Representación esquemática de la hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica.

La eficiencia de la HE depende de la actividad de las enzimas utilizadas, así como de la estructura físico-química del sustrato lignocelulósico, siendo obstaculizada por factores

como la cristalinidad y el grado de polimerización de la celulosa, el área de superficie disponible del sustrato, la barrera de lignina (contenido y distribución), el contenido de hemicelulosas, el tamaño de partícula de la materia prima, la porosidad y el grosor de la pared celular (Zhao et al., 2012). Además, entre otros factores que influyen negativamente en la HE está la presencia de compuestos de inhibición producidos durante el pre-tratamiento, como los descritos en la Sección 4.3. Por otro lado, la presencia de oligosacáridos, generados como compuestos intermedios en la misma reacción de sacarificación, han sido considerados recientemente como una posible causa de la disminución de la tasa de producción de azúcares en la HE de la BLC, al influir negativamente en la acción sinérgica de las celulasas (Wojtusik et al., 2017; Xue et al., 2015).

La lignina ha sido reportada como un importante inhibidor de la HE, aunque el mecanismo de inhibición no ha sido del todo dilucidado. Sin embargo, se han identificado tres formas principales en que la lignina contribuye a la inhibición enzimática (Rahikainen et al., 2011; Vermaas et al., 2015; Wojtusik et al., 2017):

- 1) Impedimentos estéricos.
- 2) La presencia de fragmentos solubles de lignina.
- 3) La asociación improductiva de las enzimas con la lignina mediante unión específica a través de enlaces hidrófobos o interacciones electrostáticas.

Para mejorar los rendimientos y disminuir la concentración de enzimas utilizadas en los procesos de sacarificación, que la pueden hacer económicamente inviable, los estudios se han centrado en la detección de enzimas tolerantes a inhibidores, modificaciones genéticas de enzimas conocidas, múltiples pre-tratamientos de la BLC y diseños del proceso enzimático enfocados en minimizar los efectos inhibidores (Wojtusik et al., 2017). Por otra parte, varios estudios proponen el uso de aditivos en la etapa HE, con el fin de aumentar la conversión de la celulosa en azúcares fermentables (Eriksson et al., 2002; Kristensen et al., 2007; Kumar and Wyman, 2009; Yang and Wyman, 2006), debido a que:

- Evitan la unión no productiva de las enzimas a la lignina, mejorando los rendimientos de la EH.
- La naturaleza del sustrato se modifica, aumentando así el área de superficie de celulosa disponible para las enzimas.
- Evitan la desactivación de la enzima.
- Aumentan el acceso a la celulosa y/o mejoran la actividad enzimática.

La sacarificación de la BLC pre-tratada puede llevar horas e incluso días, dependiendo de la intensidad del pre-tratamiento. La rapidez con la que transcurre la hidrólisis es un indicador de la calidad del sustrato celulósico, por lo que, en esta Tesis Doctoral, la calidad de los pre-tratamientos realizados se ha medido de acuerdo al rendimiento en glucosa que proporciona el material pre-tratado bajo condiciones preestablecidas de HE. También se ha considerado como una variable importante, el gasto energético en la etapa de pre-tratamiento y se ha considerado el empleo de diferentes aditivos en el rendimiento de la HE de PT, en base a la idea de que la conversión de celulosa a glucosa se vería beneficiada al haber mayor cantidad de enzimas activas disponibles.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abbate, V., Patanè, C., 1996. Biomass crops for energy of possible introduction to Sicily, in: Proceedings of the 9th European Bioenergy Conference. pp. 622–627.
- Almeida, J.R., Modig, T., Petersson, A., Hähn-Hägerdal, B., Lidén, G., Gorwa-Grauslund, M.F., 2007. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. J. Chem. Technol. Biotechnol. 82, 1115–1121. <https://doi.org/10.1002/jctb.1676>
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M.J., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. Bioresour. Technol. 101, 4851–4861. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>
- Bais-Moleman, A.L., Schulp, C.J.E., Verburg, P.H., 2019. Assessing the environmental impacts of production- and consumption-side measures in sustainable agriculture intensification in the European Union. Geoderma 338, 555–567.

- <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.11.042>
- Bajpai, P., 2016. Structure of Lignocellulosic Biomass Abstract, in: Springer (Ed.), Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production. Singapore, pp. 7–12. https://doi.org/10.1007/978-981-10-0687-6_2
- Balat, M., 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Convers. Manag.* 52, 858–875. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.08.013>
- Behera, S., Arora, R., Nandhagopal, N., Kumar, S., 2014. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 36, 91–106. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.047>
- Biswas, R., 2014. Production of Cellulolytic Enzymes, in: Bioprocessing of Renewable Resources to Commodity Bioproducts. pp. 105–132. <https://doi.org/10.1002/9781118845394>
- Börjesson, M., Westman, G., 2015. Crystalline Nanocellulose — Preparation, Modification, and Properties, in: In Cellulose-Fundamental Aspects and Current Trends. IntechOpen. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/61899> Abstract
- Brandt, A., Gräsvik, J., Hallett, J.P., Welton, T., 2013. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chem.* 15, 550–583. <https://doi.org/10.1039/C2GC36364J>
- Brosse, N., Hussin, M.H., Rahim, A.A., 2017. Organosolv Processes. Springer, Cham, pp. 153–176. https://doi.org/10.1007/10_2016_61
- Brown, R.M., 2004. Cellulose Structure and Biosynthesis: What is in Store for the 21st Century? *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 42, 487–495. <https://doi.org/10.1002/pola.10877>
- Carroll, A., Somerville, C., 2008. Cellulosic Biofuels. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 165–182. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.092125>
- Chandel, A.K., Antunes, F.A.F., de Arruda, P.V., Milessi, T.S.S., da Silva, S.S., de Almeida Felipe, M. das G., 2012. Dilute Acid Hydrolysis of Agro-Residues for the Depolymerization of Hemicellulose: State-of-the-Art, in: D-Xylitol. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 39–61. https://doi.org/10.1007/978-3-642-31887-0_2
- Cherubini, F., 2010. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Convers. Manag.* 51, 1412–1421.

- <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.01.015>
- Curt, M.D., Sánchez, G., Fernández, J., 2002. The potential of *Cynara cardunculus* L. for seed oil production in a perennial cultivation system. *Biomass and Bioenergy* 23, 33–46. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(02\)00030-2](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(02)00030-2)
- Dey, P.M., Brinson, K., 1984. Plant cell-walls, in: *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Elsevier, pp. 265–382.
- Eriksson, T., Börjesson, J., Tjerneld, F., 2002. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Enzyme Microb. Technol.* 31, 353–364. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00134-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00134-5)
- ESYRCE, 2018. Encuesta sobre superficies y rendimientos de consumo. Minist. Agric. Aliment. y Medio Ambient.
- Fang, G., Shen, K., 2018. Wheat Straw Pulping for Paper and Paperboard Production, in: *Global Wheat Production*. InTech, pp. 223–239. <https://doi.org/10.5772/intechopen.77274>
- FAO [WWW Document], 2019. . FAO. Food Agric. Organ. United Nations.
- Fengel, D., Wegener, G., 1989. *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter, Berlin-New York.
- Fernández, J., 1998. Cardoon. *Energy Plant Species*. James James Sci. Publ. Ltd., London 113–117.
- Fernández, J., Curt, M.D., Aguado, P.L., 2006. Industrial applications of *Cynara cardunculus* L. for energy and other uses. *Ind. Crops Prod.* 24, 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.06.010>
- Gnansounou, E., Pandey, A., 2017. Classification of Biorefineries Taking into Account Sustainability Potentials and Flexibility, *Life-Cycle Assessment of Biorefineries*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63585-3.00001-2>
- Gominho, J., Curt, M.D., Lourenço, A., Fernández, J., Pereira, H., 2018. *Cynara cardunculus* L. as a biomass and multi-purpose crop: A review of 30 years of research. *Biomass and Bioenergy* 109, 257–275. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.01.001>
- Gominho, J., Fernandez, J., Pereira, H., 2001. *Cynara cardunculus* L. - A new fibre crop for pulp and paper production. *Ind. Crops Prod.* 13, 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(00\)00044-3](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(00)00044-3)
- Gordobil, O., Moriana, R., Zhang, L., Labidi, J., Sevastyanova, O., 2016. Assesment of

- technical lignins for uses in biofuels and biomaterials: Structure-related properties, proximate analysis and chemical modification. *Ind. Crops Prod.* 83, 155–165. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.048>
- Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 100, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.027>
- Higuchi, T., 1990. Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.* 24, 23–63. <https://doi.org/10.1007/BF00225306>
- Hildebrand, J.H., Scott, R.L., 1950. The solubility of nonelectrolytes, Reinhold Pub. Co., New York 3.
- Hussin, M.H., Rahim, A.A., Mohamad Ibrahim, M.N., Brosse, N., 2015a. Improved corrosion inhibition of mild steel by chemically modified lignin polymers from *Elaeis guineensis* agricultural waste. *Mater. Chem. Phys.* 163, 201–212. <https://doi.org/10.1016/J.MATCHEMPHYS.2015.07.030>
- Hussin, M.H., Shah, A.M., Rahim, A.A., Ibrahim, M.N.M., Perrin, D., Brosse, N., 2015b. Antioxidant and anticorrosive properties of oil palm frond lignins extracted with different techniques. *Ann. For. Sci.* 72, 17–26. <https://doi.org/10.1007/s13595-014-0405-1>
- IEA, I.E.A., 2018. CO2 Emissions From Fuel Combustion 2018 Overview.
- IEA, I.E.A., 2017. Key world energy statistics.
- Isikgora, F.H., Becer, R.C., 2015. Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Platform for Production of Bio-Based Chemicals and Polymers. *Electrospinning Tissue Regen.* 6, 4497–4559. <https://doi.org/10.1039/C5PY00263J>
- Jönsson, L.J., Martín, C., 2016. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresour. Technol.* 199, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.009>
- Karimi Alavijeh, M., Karimi, K., 2019. Biobutanol production from corn stover in the US. *Ind. Crops Prod.* 129, 641–653. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.054>
- Kim, S., Dale, B.E., 2004. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy* 26, 361–375. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2003.08.002>
- Kim, Y., Kreke, T., Hendrickson, R., Parenti, J., Ladisch, M.R., 2013. Fractionation of cellulase and fermentation inhibitors from steam pretreated mixed hardwood.

- Bioresour. Technol. 135, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.130>
- Kim, Y., Ximenes, E., Mosier, N.S., Ladisch, M.R., 2011. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. *Enzyme Microb. Technol.* 48, 408–415. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.01.007>
- Klinke, H.B., Thomsen, A.B., Ahring, B.K., 2004. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 10–26. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1642-2>
- Koltuniewicz, A.B., 2014. *Sustainable Process Engineering: Prospects and Opportunities*, De Gruyter. ed.
- Koltuniewicz, A.B., Dabkowska, K., 2016. Biorefineries - Factories of the future. *Chem. Process Eng.* 37, 109–119. <https://doi.org/10.1515/cpe-2016-0011>
- Kristensen, J.B., Börjesson, J., Bruun, M.H., Tjerneld, F., Jørgensen, H., 2007. Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 888–895. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.07.014>
- Kubo, S., Kadla, J.F., 2004. Poly(ethylene oxide)/organosolv lignin blends: Relationship between thermal properties, chemical structure, and blend behavior. *Macromolecules* 37, 6904–6911. <https://doi.org/10.1021/ma0490552>
- Kumar, R., Wyman, C.E., 2009. Effect of additives on the digestibility of corn stover solids following pretreatment by leading technologies. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 1544–1557. <https://doi.org/10.1002/bit.22203>
- Lal, R., 2005. World crop residues production and implications of its use as a biofuel. *Environ. Int.* 31, 575–584. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.09.005>
- Lee, D., Owens, V., Boe, A., Jeranyama, P., 2007. *Composition of herbaceous biomass feedstocks*. North Central Sun Grant Center, South Dakota State University.
- Lozano, F.J., Lozano, R., 2017. Assessing the potential sustainability benefits of agricultural residues: Biomass conversion to syngas for energy generation or to chemicals production. *J. Clean. Prod.* 172, 4162–4169. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.01.037>
- Mathew, A.K., Parameshwaran, B., Sukumaran, R.K., Pandey, A., 2016. An evaluation of dilute acid and ammonia fiber explosion pretreatment for cellulosic ethanol production. *Bioresour. Technol.* 199, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.121>

- Méndez-Hernández, J.E., Loera, O., Méndez-Hernández, E.M., Herrera, E., Arce-Cervantes, O., Soto-Cruz, N.Ó., 2018. Fungal Pretreatment of Corn Stover by *Fomes* sp. EUM1: Simultaneous Production of Readily Hydrolysable Biomass and Useful Biocatalysts. *Waste and Biomass Valorization* 0, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0290-1>
- Menon, V., Rao, M., 2012. Trends in bioconversion of lignocellulose : Biofuels , platform chemicals & biore fi nery concept. *Prog. Energy Combust. Sci.* 38, 522–550. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2012.02.002>
- Moncada, J., Aristizábal, V., Cardona, C., 2016. Design strategies for sustainable biorefineries. *Biochem. Eng. J.* 116, 122–134. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.06.009>
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, M., 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 96, 673–86. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.025>
- Nakagame, S., Chandra, R.P., Kadla, J.F., Saddler, J.N., 2010. Enhancing the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass by increasing the carboxylic acid content of the associated lignin. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 538–548. <https://doi.org/10.1002/bit.22981>
- Nanda, S., Azargohar, R., Dalai, A.K., Kozinski, J.A., 2015. An assessment on the sustainability of lignocellulosic biomass for biorefining. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 50, 925–941. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.05.058>
- Ni, Y., Hu, Q., 1995. Alcell® lignin solubility in ethanol–water mixtures. *J. Appl. Polym. Sci.* 57, 1441–1446. <https://doi.org/10.1002/app.1995.070571203>
- NREL, 2011. What is a Biorefinery?. National Renewable Energy Laboratory. <http://www.nrel.gov/biomass/biorefinery.html>.
- Oliet, M., Gilarranz, M.A., Domínguez, J.C., Alonso, M. V., Rodríguez, F., 2005. Ethanol-based pulping from *Cynara cardunculus* L. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80, 746–753. <https://doi.org/10.1002/jctb.1217>
- Palmeros Parada, M., Osseweijer, P., Posada Duque, J.A., 2017. Sustainable biorefineries, an analysis of practices for incorporating sustainability in biorefinery design. *Ind. Crops Prod.* 106, 105–123. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.052>
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II:

- Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour. Technol.* 74, 25–33. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00161-3)
- Pienkos, P.T., Zhang, M., 2009. Role of pretreatment and conditioning processes on toxicity of lignocellulosic biomass hydrolysates. *Cellulose* 16, 743–762. <https://doi.org/10.1007/s10570-009-9309-x>
- Ragauskas, A.J., Beckham, G.T., Biddy, M.J., Chandra, R., Chen, F., Davis, M.F., Davison, B.H., Dixon, R.A., Gilna, P., Keller, M., Langan, P., Naskar, A.K., Saddler, J.N., Tschaplinski, T.J., Tuskan, G.A., Wyman, C.E., 2014. Lignin valorization: improving lignin processing in the biorefinery. *Science* (80-.). 344, 1246843. <https://doi.org/10.1126/science.1246843>
- Rahikainen, J., Mikander, S., Marjamaa, K., Tamminen, T., Lappas, A., Viikari, L., Kruus, K., 2011. Inhibition of enzymatic hydrolysis by residual lignins from softwood-study of enzyme binding and inactivation on lignin-rich surface. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 2823–2834. <https://doi.org/10.1002/bit.23242>
- Ravindran, R., Jaiswal, A.K., 2016. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: Challenges and opportunities. *Bioresour. Technol.* 199, 92–102. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.106>
- Romaní, A., Garrote, G., Alonso, J.L., Parajó, J.C., 2010. Bioethanol production from hydrothermally pretreated *Eucalyptus globulus* wood. *Bioresour. Technol.* 101, 8706–8712. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.093>
- Saini, J.K., Saini, R., Tewari, L., 2015. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech* 5, 337–353. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0246-5>
- Salapa, I., Katsimpouras, C., Topakas, E., Sidiras, D., 2017. Organosolv pretreatment of wheat straw for efficient ethanol production using various solvents. *Biomass and Bioenergy* 100, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.03.011>
- Scarlat, N., Fahl, F., Lugato, E., Monforti-Ferrario, F., Dallemand, J.F., 2019. Integrated and spatially explicit assessment of sustainable crop residues potential in Europe. *Biomass and Bioenergy* 122, 257–269. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.01.021>
- Shatalov, A.A., Pereira, H., 2011. Biorefinery of Energy Crop Cardoon (*Cynara cardunculus* L.)-Hydrolytic Xylose Production as Entry Point to Complex Fractionation Scheme. *J. Chem. Eng. Process Technol.* 02, 2–9.

- <https://doi.org/10.4172/2157-7048.1000118>
- Shrotri, A., Kobayashi, H., Fukuoka, A., 2018. Cellulose Depolymerization over Heterogeneous Catalysts. *Acc. Chem. Res.* 51, 761–768. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00614>
- Sindhu, R., Kuttiraja, M., Binod, P., Janu, K.U., Sukumaran, R.K., Pandey, A., 2011. Dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification of sugarcane tops for bioethanol production. *Bioresour. Technol.* 102, 10915–10921. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.066>
- Sjöström, E., 1993. Wood chemistry: fundamentals and applications. Gulf professional publishing, pp. 83–97.
- Sridach, W., 2010. The environmentally benign pulping process of non-wood fibers. *Suranaree J. Sci. Technol* 17, 105–123.
- Stickel, J.J., Elander, R.T., MCmillan, J.D., Brunecky, R., 2014. Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. *Bioprocess. Renew. Resour. to Commod. Bioprod.* 9781118175, 77–103. <https://doi.org/10.1002/9781118845394.ch4>
- Sun, Shaoni, Sun, Shaolong, Cao, X., Sun, R., 2016. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresour. Technol.* 199, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.061>
- Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review. *Bioresour. Technol.* 83, 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)
- Talebnia, F., Karakashev, D., Angelidaki, I., 2010. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresour. Technol.* 101, 4744–4753. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.080>
- Thammasouk, K., Tandjo, D., Penner, M.H., 1997. Influence of Extractives on the Analysis of Herbaceous Biomass †. *J. Agric. Food Chem.* 45, 437–443. <https://doi.org/10.1021/jf960401r>
- Thorenz, A., Wietschel, L., Stindt, D., Tuma, A., 2018. Assessment of agroforestry residue potentials for the bioeconomy in the European Union. *J. Clean. Prod.* 176, 348–359. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.12.143>
- UNFCCC, 2015. Adoption of the Paris Agreement. Report No. FCCC/CP/2015/L.9/Rev.1. <https://doi.org/10.1007/BF02327128>
- USCB, 2019. Population Clock [WWW Document]. URL

- <https://www.census.gov/popclock/> (accessed 3.15.19).
- Vishtal, A.G., Kraslawski, A., 2011. Challenges in industrial applications of technical lignins. *BioResources* 6, 3547–3568. <https://doi.org/10.15376/biores.6.3.3547-3568>
- Vroom, K.E., 1957. The “H” Factor: A Means of Expressing Cooking Times and Temperatures as a Single Variable. *Pulp Pap. Res. Inst. Canada* 58(3), 228–231.
- Wojtusik, M., Villar, J.C., Zurita, M., Ladero, M., Garcia-Ochoa, F., 2017. Study of the enzymatic activity inhibition on the saccharification of acid pretreated corn stover. *Biomass and Bioenergy* 98, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.01.010>
- Wood, T. M., McCrae, S.I., 1979. Synergism between enzymes involved in the solubilization of native cellulose. *Adv. Chem. Ser.* 181, 181–209.
- Wright, L., Boundy, B., Perlack, B., Saulsbury, B., 2006. *Biomass Energy Data Book*. U.S Department of Energy (DOE). Oak Ridge, TN (United States).
- Xue, S., Uppugundla, N., Bowman, M.J., Cavalier, D., Da Costa Sousa, L., Dale, B.E., Balan, V., 2015. Sugar loss and enzyme inhibition due to oligosaccharide accumulation during high solids-loading enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Biofuels* 8, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0378-9>
- Yang, B., Wyman, C.E., 2008. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* 2, 26–40. <https://doi.org/DOI:10.1002/bbb.49>
- Yang, B., Wyman, C.E., 2006. BSA Treatment to Enhance Enzymatic Hydrolysis of Cellulose in Lignin Containing Substrates. *J. Anat.* 94, 611–617. <https://doi.org/10.1002/bit.20750>
- Zhang, Y.H.P., 2008. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 367–375. <https://doi.org/10.1007/s10295-007-0293-6>
- Zhang, Y.H.P., Lynd, L.R., 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol. Bioeng.* 88, 797–824. <https://doi.org/10.1002/bit.20282>
- Zhang, Z., Harrison, M.D., Rackemann, D.W., Doherty, W.O.S., O’Hara, I.M., 2016. Organosolv pretreatment of plant biomass for enhanced enzymatic saccharification. *Green Chem.* 18, 360–381. <https://doi.org/10.1039/c5gc02034d>
- Zhao, X., Cheng, K., Liu, D., 2009. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 815–827.

<https://doi.org/10.1007/s00253-009-1883-1>

Zhao, X., Zhang, L., Liu, D., 2012. Biomass recalcitrance. Part I. Biofuels, Bioprod. Biorefining 6, 465–482. <https://doi.org/10.1002/bbb.1331>

- MATERIALES Y MÉTODOS -

En esta sección se describe de forma resumida, pues está plenamente detallado en los artículos científicos publicados o elaborados, los materiales, los equipos y los métodos analíticos utilizados para el desarrollo de esta Tesis Doctoral. En primer lugar, se presentan las materias primas, los reactivos, los reactores y los equipos analíticos empleados. A continuación, se describe el pre-tratamiento y los criterios utilizados para la selección de las condiciones óptimas de operación. Finalmente, son descritos los procedimientos experimentales utilizados para la determinación de diferentes parámetros en las materias primas y en las fracciones obtenidas, identificando los productos de degradación generados durante la etapa de pre-tratamiento, la recuperación de los componentes estructurales de la materia prima y la digestibilidad enzimática de las fracciones sólidas.

1. BIOMASAS LIGNOCELULÓSICAS

Para la realización de esta Tesis Doctoral, se han utilizado como materias primas tres biomasas lignocelulósicas (BLC), las que son descritas a continuación:

1.1 Paja de trigo

Se utilizó paja de trigo (PT), proveniente de la región de Castilla-La Mancha, España. El material fue homogenizado y secado al aire hasta obtener una humedad constante (7,0 % p/p), y almacenado en bolsas de polietileno a 23 °C hasta su utilización (Figura 15 (a)).

1.2 Tallos de *Cynara Cardunculus L.*

La segunda materia prima utilizada fueron tallos de *Cynara Cardunculus L.* (cardo), provisto por la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas (ETSIAAB) de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM) y obtenido de una plantación experimental (Programa AIR de la Unión Europea). Los tallos de cardo fueron homogenizados y secados al aire hasta una humedad constante del 13,3 % p/p y luego almacenados en bolsas de polietileno a 23 °C hasta su utilización (Figura 15 (b)).

1.3 Rastrojo de maíz

En último lugar, se utilizó rastrojo de maíz (RM) el que se compone de restos de tallos, hojas y mazorcas que quedan como residuo después de la cosecha del maíz, y que al igual que el cardo, fue provisto por la ETSIAAB de la UPM. Antes de su utilización, fue homogenizado y secado al aire hasta una humedad constante del 5,1 % p/p, y finalmente, almacenado en bolsas de polietileno a 23 °C hasta su utilización (Figura 15 (c)).



Figura 15. Materias primas preparadas para la etapa de pre-tratamiento. (a) paja de trigo (PT), (b) *Cynara Cardunculus L.* (cardo) y (c) rastrojo de maíz (RM).

Estas tres materias primas fueron caracterizadas de acuerdo con los métodos establecidos por el Laboratorio Nacional de Energía Renovable de Estados Unidos (NREL, “National Renewable Energy Laboratory”, Golden, CO, USA) (Sección 5), y pre-tratadas como se describe en la Sección 4.

2. REACTIVOS Y PRODUCTOS QUÍMICOS

A continuación, se presenta un listado de los reactivos utilizados durante el desarrollo del trabajo, así como también su procedencia y el grado de pureza (Tabla 2).

Tabla 2. Reactivos, procedencia y grado de pureza.

Reactivo	Procedencia	Grado de Pureza
Agua ultra pura Mili-Q	Millipore (Madrid, España)	Para HPLC
Agua destilada	Millipore (Madrid, España)	Para análisis
Etanol (96 % v/v)	Panreac (Barcelona, España)	Para análisis
H ₂ SO ₄ (95–97 %)	Scharlau (Barcelona, España)	Para análisis
H ₂ SO ₄ (49–51 %)	Fluka (Buchs, Suiza)	Grado HPLC
NaOH-pellets (97 %)	Sigma–Aldrich (Madrid, España)	Para análisis
Ácido cítrico ($\geq 99,5$ %)	Sigma–Aldrich (Madrid, España)	Para análisis
D-(+)-Glucosa anhidra	Scharlau (Barcelona, España)	Para análisis
D-(+)-Xilosa (> 99 %)	Sigma–Aldrich (Madrid, España)	Para análisis
L-(+)-Arabinosa (> 99 %)	Sigma–Aldrich (Madrid, España)	Para análisis
Ácido acético (99,8 %)	Sigma–Aldrich (Madrid, España)	Para análisis
HMF (> 99 %)	Sigma–Aldrich (Madrid, España)	Para análisis
Furfural (99 %)	Sigma-Aldrich (Madrid, España)	Para análisis
Polisorbato 80 (Tween 80)	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	Para Biología Molecular
Polietilenglicol-6000 (PEG)	Fisher Scientific (Loughborough, UK)	Para Biología Molecular
Albúmina de suero bovino (BSA, “bovine serum albumin”) ($\geq 98,0$ %)	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	Para análisis
Caseína (CAS) (pura)	Acros (New Jersey, USA)	Para análisis
Leche desnatada en polvo (SMP, “skimmed milk powder”)	Scharlau, Barcelona, España	Para Microbiología

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución (“high performance liquid chromatography”)

3. EQUIPOS

En este apartado se describen los equipos utilizados durante la realización de las distintas etapas experimentales que forman parte de esta Tesis Doctoral.

3.1. Reactores

A continuación se describen los distintos sistemas de reacción utilizados en la etapa de pre-tratamiento, caracterización de materias primas y materiales pre-tratados obtenidos, así como también en la realización de los ensayos de digestibilidad enzimática de los mismos:

- **Matraces Erlenmeyer (vidrio tapa/rosca GL rosca/SIMAX):** Matraces de 100 mL de capacidad, utilizados en los ensayos de digestibilidad enzimática de las materias primas y de los sólidos pre-tratados obtenidos.
- **Tubos de ensayo (1622-20M/Pyrex):** Tubos de vidrio de 75 mL de capacidad, utilizados durante la etapa de hidrólisis ácida de la caracterización química (NREL) (Sluiter et al., 2008) de las materias primas y de los sólidos pre-tratados obtenidos.
- **Autoclave (STERICLAV-S 75L/RAYPA):** Equipo con software incorporado que permite mantener las condiciones indicadas por NREL (Sluiter et al., 2008) (121 °C; 60 min) a partir de vapor de agua a elevada temperatura. Utilizado en la etapa de hidrólisis ácida diluida de la caracterización química de las materias primas y de los sólidos pre-tratados obtenidos.
- **Digestor (Tanque) (MAWP 2000 PSI/Autoclave Engineers, INC.):** Equipo de acero inoxidable y 6 L de capacidad, utilizado para la etapa de pre-tratamiento (Figura 16). Funciona por cargas, introduciendo en cada experiencia 100 g secos de materia prima y el volumen correspondiente del líquido de cocción, el cual es aspirado desde el fondo del reactor mediante una bomba de arrastre magnético, para luego ser reintroducido en forma de ducha en la parte superior, asegurando una

impregnación homogénea del material. Por ordenador, se controla la temperatura del proceso, gracias a una camisa calefactora de 2000 W, así como también las secuencias de activación de las válvulas neumáticas que permiten tomar cantidades controladas de muestra líquida a distintos tiempos a lo largo del proceso. Finalmente, al transcurrir el tiempo de pre-tratamiento, el reactor es enfriado rápidamente mediante la activación de circulación de agua a través de una camisa de refrigeración.

Además, este equipo cuenta con accesorios como por ejemplo; zonas de refrigeración en las tuberías de recirculación del material y toma de muestra, válvula de purga, controlador termopar y de presión para determinación en tiempo real, válvula de seguridad y disco de ruptura para el alivio instantáneo de sobrepresiones o depresiones durante el proceso.



Figura 16. Digestor (Tanque) (MAWP 2000 PSI/Autoclave Engineers, INC.), utilizado para realizar los diferentes pre-tratamientos.

3.2. Equipos Auxiliares

A continuación, se describen los equipos auxiliares utilizados en la realización de este trabajo:

- **Estufa (Heraeus B6 incubator/Thermo Scientific):** Equipo que permite mantener una temperatura constante de 40 a 250 °C, utilizado para secar los materiales sólidos en los análisis gravimétricos (105 °C durante 24 h).
- **Horno de Mufla (12-PR-210/Heron):** Equipo con placas calefactoras con resistencia térmicas en su interior, usado para la incineración y secado de materiales sólidos, pudiendo alcanzar temperaturas de hasta 1200 °C. En este trabajo se utilizó para la incineración a 595 °C de las materias primas en la determinación del contenido de cenizas.
- **Agitador orbital (UNIMAX 2010/Heidolph):** Equipo que proporciona un movimiento circular suave y uniforme, utilizado en los ensayos de digestibilidad enzimática de las fracciones sólidas (150 rpm), para asegurar una correcta homogenización de las muestras.
- **Nevera (1PUERTA 3FC1601B/Balay):** Permite el almacenamiento y conservación de las muestras (líquidas y sólidas), a 4 °C, durante un corto periodo de tiempo.
- **Congelador (GT 4232 Comfort/Liebherr):** Permite el almacenamiento y conservación de las muestras (líquidas y sólidas), a -20 °C, durante un periodo de tiempo mayor.
- **Balanza de precisión digital (BP 2015/Sartorius):** Utilizada para determinar el peso exacto de una muestra.
- **Bomba (arrastre magnético) (Bombas serie D/Tuthill):** Su función es asegurar una impregnación homogénea dentro del digestor durante el pre-tratamiento.

- **Baño termostático (C10-P14/Thermo Scientific):** Este equipo está formado por dos partes principales: (1) el baño termostático de circulación con calentamiento-refrigeración que consiste en un recipiente abierto donde se deposita el agua, y (2) el termostato de inmersión que permite controlar la temperatura (-20 a 200 °C). Se ha utilizado para la hidrólisis ácida del procedimiento de caracterización química (NREL) (Sluiter et al., 2008) de los materiales pre-tratados y las materias primas.
- **Desintegrador (MK.IIIC/Messmer Instruments):** Equipo con la capacidad de separar las fibras de los sólidos pre-tratados obtenidos. Consta de un vaso de acero inoxidable, un agitador mecánico de 3 aspas y un sistema de control para seleccionar las condiciones de funcionamiento (velocidad de agitación, tiempo y ciclos).
- **Equipo de filtrado:** Aparato asociado al equipo de vacío, utilizados para separar las fracciones líquida y sólida después de los pre-tratamientos.
- **Centrífuga (Mini Spin/Eppendorf):** Equipo que permite separar la fracción líquida de la sólida de una muestra, mediante sedimentación de esta última. Se ha utilizado en las muestras tomadas a distintos tiempos de reacción en los ensayos de digestibilidad enzimática, donde el sobrenadante es filtrado y analizado mediante cromatografía (Sección 6.2).
- **pH-metro (pH & Ion-Meter GLP 22⁺/Crison):** Formado por un electrodo de cristal que permite determinar el pH de una muestra líquida.
- **Molino de impacto de palas (Mühle/Retsch):** Equipo utilizado para la trituración de las materias primas y los sólidos pre-tratados antes de su caracterización química (Hames et al., 2008). El material sólido es alimentado por una tolva, y pasa a la parte central de la cámara de molienda. Aquí entra en el campo de acción del rodete de 3 palas y es triturado por efectos de choque y cizallamiento entre las placas de impacto y la pieza molturadora dentada, desde donde cae al recipiente colector. El aire aspirado a través de la tolva por el efecto de giro del rodete de palas acelera la evacuación del material molido.

- **Tamizador (IRIS FTS-0200/Filtra Vibración):** Tamizador electromagnético para tamices de 60 a 203 mm de diámetro. Dispone de carátula digital con regulación de potencia, control de tiempo y modo de ajuste para tamizar en continuo o intermitentemente. Los tamices son sujetados por medio de varillas roscadas, pomos de baquelita y tapa de metacrilato. Se utilizó para separar las fracciones finas de las gruesas de los materiales sólidos previamente molidos (Hames et al., 2008).
- **Equipo de vacío (por aire):** Genera vacío mediante una bomba de succión de aire regulada manualmente. Utilizado para filtrar los materiales obtenidos del pre-tratamiento y obtener una fracción líquida y otra sólida.
- **Desecador:** Instrumento de laboratorio de vidrio con tapa (cierre hermético) que permite proteger una sustancia de la humedad, además de eliminar la humedad que contenga. Consta de una cámara principal donde se coloca la muestra y una parte inferior (cámara secundaria) donde se coloca una sustancia desecante (en este caso sílice). Además cuenta con una válvula en la tapa, que genera vacío.

3.3. Equipos de análisis

3.3.1. Cromatografía líquida de alta resolución

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, “High performance liquid chromatography”) fue el principal método de medición utilizado en este trabajo. Se utilizó para determinar la composición de las materias primas, los materiales pre-tratados y las muestras líquidas obtenidas periódicamente de los ensayos de pre-tratamiento (Sluiter et al., 2008) y sacarificación enzimática. Específicamente, para determinar la concentración de glucosa, xilosa, arabinosa, ácido acético, HMF y furfural.

Se utilizó un equipo **Agilent Technology 1260** (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA.) con una **columna Aminex HPX-87H** (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA.), a 50 °C, una fase móvil acuosa de H₂SO₄ (5 mmol/L) y un caudal de 0,6 mL/min. Además, este equipo cuenta con:

- **Ordenador o Sistema de datos:** Encargado de controlar los módulos del HPLC, utilizando las señales del detector para determinar los tiempos de retención de los diferentes componentes de las muestras y su cantidad.
- **Detector de índice de refracción (RID; “refractive index detector”) (G1362A 1260 RID, Agilent Technologies; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA):** Mide la capacidad de las moléculas para refractar la luz en la celda de la fase móvil con respecto a la celda de la fase estacionaria (referencia). El fotorreceptor de luz contiene dos diodos que producen una corriente eléctrica, proporcional a la cantidad de luz refractada y por tanto a la concentración de la sustancia detectada.
- **Bomba cuaternaria:** Encargada de generar gradientes por mezcla de baja presión de cuatro canales de solventes individuales, con el fin de impulsar la fase móvil a través del circuito del HPLC con un caudal específico. Los intervalos de caudal que este equipo permite están entre 0,1 y 5 (mL/min) y una presión entre 1 y 450 (bar).
- **inyector automático:** Introduce las muestras líquidas (5-20 mL) a analizar en el flujo de la fase móvil.
- **Compartimento de columna termostatzado:** Permite controlar la temperatura entre 5 y 99 °C.
- **Micro-desgasificador de vacío:** Desgasifica la fase móvil eliminando la necesidad de burbujear helio.

3.3.2. Espectrofotometría

Se utilizó un espectrofotómetro V-730 UV (Jasco Inc, Japan), con cubetas de cuarzo para determinar el contenido de lignina soluble en ácido (LSA) de las fracciones sólidas obtenidas del pre-tratamiento, después de aplicarles una hidrólisis ácida (Sección 5.1), midiendo la absorbancia a 205 nm.

3.3.3. Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier

La espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR, “Fourier-transform infrared spectroscopy”) es un método no destructivo de análisis que se utilizó para examinar cambios en la estructura de los materiales que pudieran surgir a raíz del pre-tratamiento químico. Se utilizó un espectrofotómetro FTIR-4600 (Jasco Inc, Japan), equipado con un diamante accesorio de reflexión única, para obtener los espectros en la región media ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$) de cada muestra.

3.3.4. Microscopía electrónica de barrido

La morfología de las materias primas y de las muestras sólidas obtenidas después del pre-tratamiento fue estudiada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, “scanning electron microscope”), utilizando un microscopio JSM 6400 (JEOL, Boston, MA, USA), perteneciente al Centro Nacional de Microscopía Electrónica (CNME), de la Universidad Complutense de Madrid. Este equipo cuenta con:

- **Cañón de electrones de cátodo termoiónico con filamento de tungsteno:** Permite generar y dirigir con energía suficiente un haz de electrones.
- **Detector de electrones secundarios:** Permite resoluciones de imagen de 3,5 nm (a 8 mm de distancia de trabajo) a 10,0 nm (a 39 mm de distancia de trabajo).
- **Detector de electrones retrodispersados:** Permite una resolución de imagen de 10,0 nm (a 8 mm de distancia de trabajo).
- **Medidor de energía dispersada por espectroscopía de rayos X (EDS, “Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy”):** Permite realizar un análisis elemental cualitativo con una resolución de 133 eV.

3.3.5. Difracción de rayos X y determinación de la cristalinidad

Se estudió la cristalinidad de las materias primas y de los sólidos pre-tratados obtenidos mediante difracción de rayos X (DRX), usando un difractómetro multipropósito X'Pert MPD (PANalytical BV, Netherlands) perteneciente al Centro de Apoyo a la Investigación (CAI, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid), equipado con:

- **Generador de rayos X PANalytical PW3040/60 (Cobre) y un detector proporcional.**
- **Dos goniómetros en configuración vertical θ - 2θ , con óptica Bragg-Brentano** (rendijas fijas, monocromador secundario curvo y detector proporcional sellado de Xe). Uno de los goniómetros cuenta con una plataforma porta-muestras multipropósito, que permite medir sobre muestras de hasta 1 kg y 10×10×10 cm. Mientras que el otro, cuenta con un dispositivo de rotación de muestras ("spinner") asociado a un cambiador automático de muestras con 21 posiciones.

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El trabajo realizado en esta Tesis Doctoral para el fraccionamiento y posterior caracterización de las fracciones obtenidas se esquematiza en la Figura 17. En ella se incluyen los principales pasos del proceso experimental, cuyas principales características se detallan a continuación.

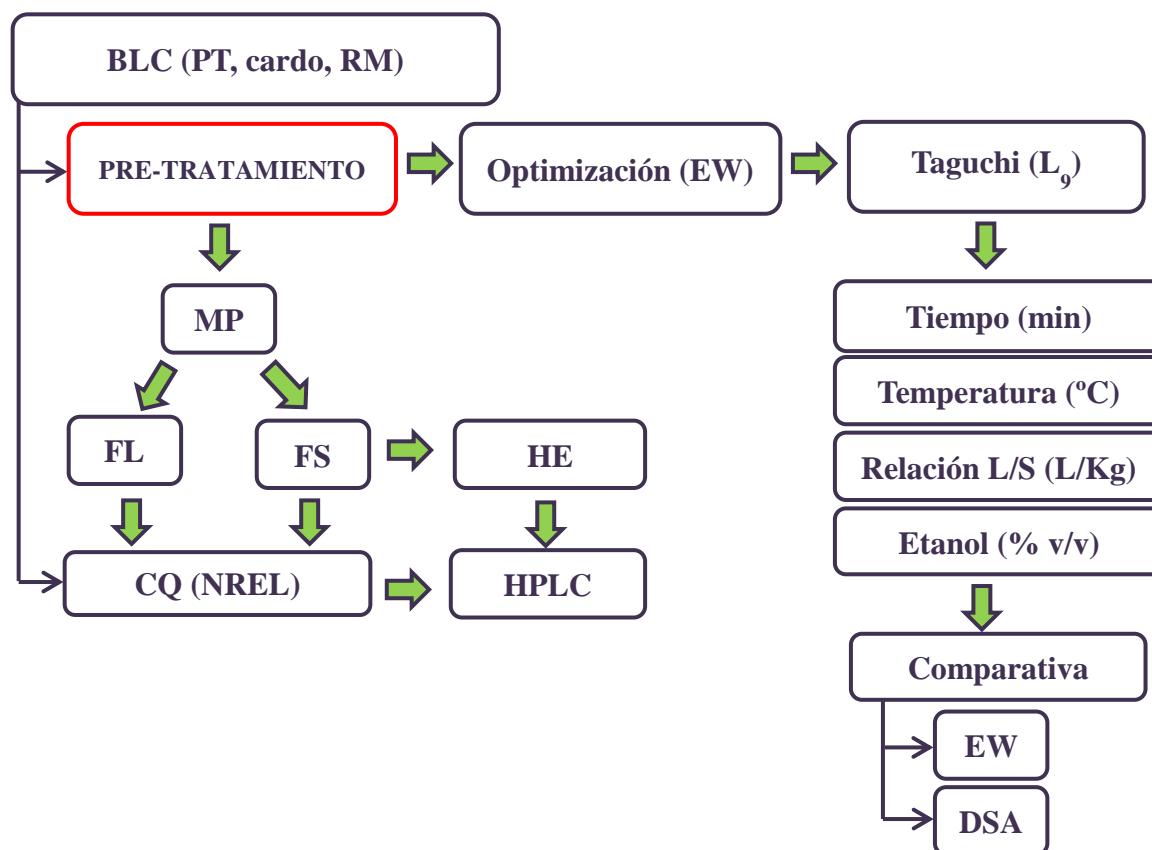


Figura 17. Esquema general del proceso experimental. **BLC:** biomasa lignocelulosa; **PT:** paja de trigo; **cardo:** *Cynara Cardunculus L.*; **RM:** rastrojo de maíz; **EW:** pre-tratamiento con una mezcla de etanol-agua; **L/S:** relación líquido/sólido (L/Kg) **DSA:** pre-tratamiento con ácido sulfúrico diluido; **MP:** material pre-tratado; **FL:** fracción líquida; **FS:** fracción sólida; **HE:** hidrólisis enzimática; **CQ:** caracterización química.

4.1. Pre-tratamiento de la biomasa lignocelulósica

Las materias primas fueron fraccionadas, por separado, bajo varias condiciones de operación mediante dos tipos de pre-tratamientos:

- 1) **Proceso de deslignificación con etanol:** Utilizando una mezcla de etanol y agua (EW, “ethanol-water”) suplementado con 1,0 % p/p de H_2SO_4 (sobre sólido seco) como catalizador.

- 2) Proceso de Hidrólisis con ácido sulfúrico diluido** (DSA, “diluted sulfuric acid”): Utilizando una solución acuosa de H_2SO_4 al 1,0 % (p/p) (sobre sólido seco).

Cada pre-tratamiento se llevó a cabo introduciendo 100 g secos de materia prima y el volumen correspondiente de la mezcla EW o DSA en el digestor, y calentándolo a la temperatura deseada. Al transcurrir el tiempo de pre-tratamiento fijado, el reactor es enfriado rápidamente mediante la activación de circulación de agua fría a través de una camisa de refrigeración. A continuación, el material pre-tratado es filtrado al vacío, para obtener una fracción líquida, la que se almacenó a 4 °C para su posterior análisis, y una fracción sólida pre-tratada, la que debe ser lavada extensamente con agua para eliminar los compuestos de degradación generados a partir de los componentes principales de la BLC durante el pre-tratamiento. Posteriormente, las fracciones sólidas fueron desintegradas y homogenizadas durante 5 min y nuevamente filtradas, secadas al aire, homogenizadas, y almacenadas a 23 °C en bolsas de polietileno selladas hasta su utilización. La cantidad de energía involucrada en el pre-tratamiento ha sido calculada utilizando el factor H, el que es definido por la ecuación 1 (Introducción).

Finalmente, las fracciones líquidas y sólidas obtenidas fueron caracterizadas químicamente de acuerdo con los procedimientos formulados por NREL (Hames et al., 2008; Sluiter et al., 2008), como se indica en la Sección 5, para de esta forma, evaluar el efecto del pre-tratamiento en la materia prima en términos de recuperación de sólidos (RS, %), recuperación de glucanos (RG, %), hidrólisis de xilanos (HX, %), eliminación de grupos acetilos (EGA, %), grado de deslignificación (GD, %) y digestibilidad de la fracción de celulosa en la producción de glucosa o hidrólisis enzimática (HE, %).

Sin embargo, antes de realizar la comparación de los pre-tratamientos EW y DSA, los parámetros del proceso EW fueron evaluados y optimizados, para poder hacer una comparación sólo en términos de energía, es decir, de tiempo y temperatura, debido a que ambos parámetros influyen en el consumo de energía (factor H). Para esto se utilizó la metodología Taguchi (L_9), la que es descrita a continuación.

4.2. Diseño de experimentos

El diseño de experimentos Taguchi es un método estadístico desarrollado por el estadístico e ingeniero japonés Genichi Taguchi en los años 50 para investigar los efectos de diferentes parámetros en la varianza de la característica que determina las condiciones de funcionamiento adecuadas de un proceso (Kumar et al., 2015). Taguchi emplea matrices ortogonales, que organizan las variables que afectan al proceso y sus niveles, de la manera más probable que afecten el proceso. Además, ofrece la oportunidad de reducir el número de experimentos, probando pares de combinaciones, ahorrando tiempo y recursos. Permite calcular una relación señal/ruido (relación S/N) basada en datos experimentales, que define las mejores condiciones experimentales, considerando la calidad del producto o el rendimiento del proceso dentro del intervalo experimental probado (Bose et al., 2013).

En este estudio, se utilizó el método Taguchi (L_9), para investigar el efecto de cuatro parámetros de operación y así obtener un proceso óptimo dentro del rango evaluado. Los parámetros seleccionados fueron: tiempo (min), temperatura ($^{\circ}\text{C}$), relación líquido/sólido (L/S) (L/kg) y contenido de etanol (% v/v). La información detallada de la metodología Taguchi utilizada, es recogida en las Publicaciones 1 y 2, que componen esta Tesis.

5. MÉTODOS de ANÁLISIS

5.1. Análisis de las fracciones líquidas

El análisis de la composición de las fracciones líquidas obtenidas partir de los distintos pre-tratamientos se realizó mediante HPLC (Sección 3.3.1). Para esto, se filtró una alícuota (1 ml) de cada licor, a través de una membrana de 0,45 μm y luego se inyectó en el cromatógrafo. De esta manera se determinó la concentración de glucosa, xilosa, arabinosa, ácido acético, HMF y furfural. Además, se utilizó un espectrofotómetro (Sección 3.3.2) para determinar el contenido de lignina soluble en ácido (LSA) de las fracciones sólidas. Finalmente, se midió el pH de los licores obtenidos después de cada pre-tratamiento.

5.2. Análisis de las fracciones sólidas

La composición y las características fundamentales de las materias primas utilizadas en esta Tesis Doctoral y de todos los sólidos pre-tratados obtenidos fue determinada utilizando la metodología propuesta por NREL (Hames et al., 2008; Sluiter et al., 2008). Los procedimientos empleados determinan el contenido en azúcares monoméricos. Se asume que toda la glucosa proviene de la celulosa, que la xilosa, arabinosa y galactosa provienen de las hemicelulosas y que todos los azúcares están en forma polimérica. Es por ello que los contenidos en celulosa y en hemicelulosas se calcularon aplicando el factor de corrección correspondiente a la ganancia de peso por la adición de una molécula de agua al hidrolizar los enlaces glucosídicos (1,11 en el caso de las hexosas y 1,13 en el caso de las xilosas).

5.2.1. Recuperación de sólidos

La recuperación de sólidos (RS) después de la etapa de pre-tratamiento fue determinada gravimétricamente después del secado de una muestra de la fracción sólida en horno (a 105 °C) hasta obtener peso constante, de acuerdo con la ecuación (2):

$$RS (\%) = \left(\frac{P_{SP}}{P_O} \times 100 \right) \quad (2)$$

Donde P_{SP} es el peso seco del material sólido pre-tratado y P_O es el peso seco de la materia prima original empleada en el pre-tratamiento.

5.2.2. Análisis del contenido de glucanos, xilanos y lignina (Klason)

Se utilizó la concentración de glucosa, xilosa, ácido acético y lignina insoluble en ácido (LIA) para calcular el contenido de glucano, xilano, grupos acetilos y lignina, respectivamente, en los materiales pre-tratados, y de esta forma determinar la GR, HX, EGA y GD, usando las siguientes ecuaciones ((3)-(6)):

$$RG (\%) = \left(\frac{G_P}{G_O} \cdot 100 \right) \quad (3)$$

$$HX (\%) = \left(1 - \frac{X_P}{X_O} \right) \times 100 \quad (4)$$

$$EGA(\%) = \left(1 - \frac{GA_P}{GA_O} \right) \times 100 \quad (5)$$

$$GD (\%) = \left(1 - \frac{L_P}{L_O} \right) \times 100 \quad (6)$$

Donde G_P , X_P , GA_P y L_P son el peso de glucano, xilano, grupos acetilos y lignina, respectivamente, en el material pre-tratado (en base seca) y G_O , X_O , GA_O y L_O son sus valores en la materia prima original (no tratada).

5.2.3. Análisis por espectroscopía y microscopía

5.2.3.1. Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier

Se utilizó un espectrofotómetro FTIR-4600 (Sección 3.3), con una resolución de 2 cm^{-1} , para obtener 200 exploraciones en la región espectral entre $4000\text{-}650 \text{ cm}^{-1}$. Las salidas espectrales fueron registradas en modo de transmitancia como una función del número de onda.

5.2.3.2. Difracción de rayos X y determinación de la cristalinidad

Se estudió la cristalinidad de las materias primas y los sólidos pre-tratados, usando un difractómetro multipropósito X'Pert MPD (Sección 3.3). Se estudió el rango angular $2\theta = 5\text{-}40^\circ$, donde los datos de difracción son adquiridos al exponer las muestras (polvo) a la radiación de rayos X Cu-K α ($\lambda = 1.5408 \text{ \AA}$) con 45 kV y una corriente de 30 mA. La cristalinidad se calculó a partir de los datos de intensidad de difracción. Los índices de cristalinidad (CrI, %) de las muestras se calcularon en cada caso utilizando la ecuación 7:

$$CrI(\%) = \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \quad (7)$$

Donde I_{002} es la intensidad de la difracción 002 a $2\theta = 22.5^\circ$ y representa tanto regiones cristalinas como amorfas, mientras que, I_{am} es la intensidad de difracción a $2\theta = 18^\circ$ y representa la región amorfa (Puri, 1984; Segal et al., 1959).

5.2.3.3. Microscopía electrónica de barrido

La morfología de las materias primas y las muestras sólidas obtenidas del pre-tratamiento fueron estudiadas utilizando un microscopio JSM 6400 (Sección 3.3) a 25 kV y con una resolución máxima de 3,5 nm y una distancia de trabajo de 8 mm. Antes de la observación, las muestras fueron acondicionadas durante 24 h en estufa a 50 °C y luego se realizó evaporación con grafito y metalización con oro.

6. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Se realizaron ensayos de hidrólisis enzimática (HE) de las materias primas y las fracciones sólidas obtenidas después de cada pre-tratamiento, para evaluar su digestibilidad y con ellos tener una idea de las calidades de los sólidos en cuanto a la accesibilidad a la celulosa. Los ensayos se realizaron, por duplicado, en matraces Erlenmeyer de 100 ml, usando tampón citrato de sodio 0,05 M (pH 4,8) a 50 °C y 150 rpm durante 72 h, con una consistencia de sustrato del 10 % (p/v, base seca).

Se empleó celulasa (Celluclast 1,5L) de *Trichoderma reesei* ATCC26924 (Sigma-Aldrich Co., Ltd, EE. UU), suplementada con celobiasa (Novozyme 188) (Sigma-Aldrich Co., Ltd, EE. UU). Las actividades enzimáticas fueron 70 FPU•g⁻¹ y 1274 IU•g⁻¹, para la celulasa y la celobiasa, respectivamente. La carga enzimática utilizada de celulasa y celobiasa fue de 20 FPU/g y 40 IU/g, respectivamente.

6.1. Uso de aditivos para mejorar la hidrólisis enzimática

Se determinó el efecto del uso de diferentes aditivos en el rendimiento de la HE de PT, basado en la idea de que la conversión de celulosa a glucosa sería beneficiada al haber mayor cantidad de enzimas disponibles para la hidrólisis. Los compuestos utilizados como aditivos (Tabla 3) fueron clasificados como: **(1) surfactantes (no iónicos):** Tween 80 (TW) y Polietilenglicol-6000 (PEG), y **(2) proteínas:** albúmina de suero bovino (BSA), caseína (CAS), leche desnatada en polvo (SMP, “Skimmed milk powder”).

Tabla 3. Concentración de aditivos (surfactantes y proteínas).

Aditivos	Concentración (% sobre MS)		
	Baja	Media	Alta
Surfactantes (no-iónico)			
TW (v/v)	1,07	10,7	53,5
PEG (g/g MS)	1	10	50
Proteínas			
BSA (g/g MS)	1	10	50
CAS (g/g MS)	1	10	50
SMP (g/g MS)	3	30	150

MS: materia seca; **TW:** Tween 80; **PEG:** Polietilenglicol-6000; **BSA:** albúmina de suero bovino; **CAS:** caseína; **SMP:** leche desnatada en polvo.

Se utilizó un exceso de la enzima Biogazyme 2X, una celulasa de *Trichoderma spp.* proporcionada por ASA Spezialenzyme-Wolfenbüttel, Alemania, bajo las mismas condiciones de reacción descritas anteriormente (Sección 6). Antes de la adición de la enzima, las mezclas de reacción se complementaron con uno de los cinco aditivos, en tres concentraciones diferentes (Tabla 3), y se incubaron durante toda la noche a 50 °C y 150

rpm para permitir que los aditivos se dispersaran uniformemente en la muestra. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

6.2. Determinación de azúcares y rendimiento de hidrólisis enzimática

Durante la HE, se tomaron muestras periódicas (3, 6, 24, 48 y 72 h) de una porción de hidrolizado (1 ml) y se centrifugaron durante 5 min a $1,3 \times 10^5$ rpm (18928 g), para separar el hidrolizado de los residuos sólidos. El sobrenadante obtenido se filtró a través de un filtro de 0,45 μm y se analizó mediante HPLC para determinar la concentración de azúcares presentes en la muestra y de esta forma calcular el rendimiento de la etapa de HE, de acuerdo con la ecuación (8) (Rocha et al., 2013):

$$HE = \left(\frac{m_g \times f_h}{m_o \times y_i} \right) \times 100 \quad (8)$$

Donde m_g es la masa de glucosa en el hidrolizado (g), f_h es el factor de conversión de glucosa a celulosa (considerando la adición de agua en la hidrólisis de celulosa $f_h = 0,9$); m_o es la masa seca inicial del material a hidrolizar (g) e y_i es la fracción de celulosa en el material (g/g).

6.3. Método de cálculo de parámetros y ajustes cinéticos

Se utilizó el modelo cinético fractal, un modelo potencial *ab initio* de primer orden, basado en los supuestos de Kopelman con respecto a geometrías y modelos fractales, cuya constante cinética cambia con el tiempo (Kopelman, 1988; Wang and Feng, 2010; Wojtusik et al., 2016), para describir la evolución fenomenológica, basada en criterios fisicoquímicos y estadísticos, de la HE para la PT pre-tratada en condiciones de alta y baja severidad.

Para ajustes sencillos de una sola variable independiente se utilizó el software OriginLab 8, el que permite el tratamiento matemático sencillo de los datos experimentales obtenidos, así como ajustes multi-paramétricos unidimensionales. Además, se utilizó el software Aspen Custom Modeler V7.3 (Aspen Technology, Inc., Burlington, USA, 2011),

el cual implementa un algoritmo de Levenberg-Marquardt, un método de regresión no lineal, junto con una integración numérica Runge-Kutta de cuarto orden para obtener los parámetros necesarios para la determinación de las ecuaciones cinéticas para el modelo fractal. Además, permite simular los resultados obtenidos para un conjunto de parámetros cinéticos, permitiendo determinar su idoneidad y su consistencia estadística.

La información detallada utilizada para la descripción fenomenológica es recogida en la Publicación V, que compone esta Tesis.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Bose, P.K., Deb, M., Banerjee, R., Majumder, A., 2013. Multi objective optimization of performance parameters of a single cylinder diesel engine running with hydrogen using a Taguchi-fuzzy based approach. *Energy* 63, 375–386.
<https://doi.org/10.1016/j.energy.2013.10.045>
- Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, A., Sluiter, J., Templeton, D., 2008. Preparation of Samples for Compositional Analysis. *Natl. Renew. Energy Lab.* 1–9.
- Kopelman, R., 1988. Fractal Reaction Kinetics. *Science* (80-.). 241, 7.
<https://doi.org/10.1620/241.4837>
- Kumar, R.S., Sureshkumar, K., Velraj, R., 2015. Optimization of biodiesel production from Manilkara zapota (L.) seed oil using Taguchi method. *Fuel* 140, 90–96.
- Puri, V.P., 1984. Effect of crystallinity and degree of polymerization of cellulose on enzymatic saccharification. *Biotechnol. Bioeng.* 26, 1219–1222.
<https://doi.org/10.1002/bit.260261010>
- Rocha, G.J.M., Silva, V.F.N., Martín, C., Gonçalves, A.R., Nascimento, V.M., Souto-Maior, A.M., 2013. Effect of Xylan and Lignin Removal by Hydrothermal Pretreatment on Enzymatic Conversion of Sugarcane Bagasse Cellulose for Second Generation Ethanol Production. *Sugar Tech* 15, 390–398.
<https://doi.org/10.1007/s12355-013-0218-9>
- Segal, L., Creely, J.J., Martin, A.E., Conrad, C.M., 1959. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. *Text. Res. J.* 29, 786–794.
<https://doi.org/10.1177/004051755902901003>

- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., 2008. Determination of Sugars , Byproducts , and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date : 12 / 08 / 2006 Determination of Sugars , Byproducts , and Degradation Products in Liquid Fraction Proce. Lab. Anal. Proced. NREL/TP-510-42623 1–14. <https://doi.org/TP-510-42623>
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D., 2008. Determination of structural carbohydrates and lignin in Biomass. Natl. Renew. Energy Lab. 17. <https://doi.org/NREL/TP-510-42618>
- Wang, Z., Feng, H., 2010. Fractal kinetic analysis of the enzymatic saccharification of cellulose under different conditions. Bioresour. Technol. 101, 7995–8000. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.056>
- Wojtusik, M., Zurita, M., Villar, J.C., Ladero, M., Garcia-Ochoa, F., 2016. Enzymatic saccharification of acid pretreated corn stover: Empirical and fractal kinetic modelling. Bioresour. Technol. 220, 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.069>

**- JUSTIFICACIÓN DE LA UNIDAD
TEMÁTICA DEL TRABAJO -**

1. Resumen de resultados y trabajos realizados

En esta sección se describen los principales resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Estos resultados se encuentran publicados en revistas científicas, las separatas han sido incluidas en la sección “Anexo” del presente documento. Este resumen se va a dividir en cuatro secciones principales:

- 1) Estudio y optimización de las variables de operación de la etapa de pre-tratamiento mediante una mezcla de etanol-agua (EW), buscando obtener un material sólido bien deslignificado, una alta hidrólisis de las hemicelulosas y una alta digestibilidad enzimática de la celulosa; todo ello con el menor gasto energético posible. Estos resultados son recogidos en las Publicaciones I y II, sobre paja de trigo (PT) y tallos de *Cynara Cardunculus L.* (cardo), respectivamente.
- 2) Comparación de los resultados obtenidos mediante el pre-tratamiento EW con los obtenidos al aplicar el pre-tratamiento con ácido sulfúrico diluido (DSA, “diluted sulfuric acid”), para similares niveles de energía consumida. Estos resultados son mostrados en la Publicación III, PT, cardo y rastrojo de maíz (RM).
- 3) Mejora de la sostenibilidad ambiental del proceso, evaluando la estrategia de re-utilización del licor obtenido en la etapa de pre-tratamiento (partiendo de las condiciones óptimas descritas en la Publicación I). Los resultados son objeto de la Publicación IV.
- 4) Mejora de la digestibilidad enzimática de la PT mediante el uso de aditivos (surfactantes no iónicos y proteínas), capaces de bloquear la actividad inhibidora de la lignina. Los resultados se recogen en la Publicación V.

Cada una de estas publicaciones contiene un breve estado del arte del tema principal, la metodología utilizada, los resultados experimentales, su interpretación, su discusión, y las

conclusiones derivadas de las mismas. A continuación, se presenta una relación de las publicaciones científicas incluidas en esta Tesis Doctoral.

2. Relación de publicaciones

Publicación I: Optimización del fraccionamiento de la paja de trigo mediante una mezcla de etanol-agua y la comparación con el pre-tratamiento con ácido sulfúrico diluido

Autores: Priscilla Vergara, Mateusz Wojtusik, Esteban Revilla, Miguel Ladero, Félix García-Ochoa, Juan C. Villar.

Título: Wheat straw fractionation by ethanol-water mixture: Optimization of operating conditions and comparison with diluted sulfuric acid pre-treatment.

Revista: Bioresource Technology. 256 (2018) 178-186.

Publicación II: Optimización del fraccionamiento de *Cynara Cardunculus L.* (cardo) mediante una mezcla de etanol-agua

Autores: Priscilla Vergara, Miguel Ladero, Félix García-Ochoa, Juan C. Villar.

Título: Valorisation of *Cynara Cardunculus* crops by ethanol-water treatment: Optimization of operating conditions.

Revista: Industrial Crops and Products. 124 (2018) 856-862.

Publicación III: Comparativa del pre-tratamiento de tres biomásas lignocelulósicas mediante una mezcla de etanol-agua y la comparación con el pre-tratamiento con ácido sulfúrico diluido

Autores: Priscilla Vergara, Miguel Ladero, Félix García-Ochoa, Juan C. Villar.

Título: Pre-treatment of corn stover, *Cynara Cardunculus L.* stems and wheat straw by ethanol-water and diluted sulfuric acid: comparison under different energy input conditions.

Revista: Bioresource Technology. 270 (2018) 449-456.

Publicación IV: Re-utilización del licor de pre-tratamiento de paja de trigo con mezclas etanol-agua

Autores: Priscilla Vergara, Félix García-Ochoa, Miguel Ladero, Soledad Gutiérrez, Juan C. Villar.

Título: Liquor re-use strategy in lignocellulosic biomass fractionation with ethanol-water mixtures.

Revista: Bioresource Technology. 280 (2019) 396-403.

Publicación V: Utilización de aditivos para la mejora de la hidrólisis enzimática de paja de trigo con mezclas etanol-agua

Autores: Priscilla Vergara, José M. Carbajo, Miguel Ladero, Félix García-Ochoa, Juan C. Villar.

Título: Use of additives to improve the enzymatic hydrolysis of pre-treated wheat straw with an ethanol-water mixture.

Revista: Biomass & Bioenergy. *Sended for publication.*

3. Justificación de la unidad temática del trabajo

Como se ha mencionado anteriormente, los resultados obtenidos pueden ser clasificados principalmente en cuatro secciones que se exponen a continuación.

3.1. Estudio y optimización de las variables del proceso de pre-tratamiento con mezclas de etanol-agua

En este apartado se incluye el estudio de las condiciones de operación que influyen directamente en el pre-tratamiento EW de la BLC, utilizando 1% de H₂SO₄ (sobre masa seca) como catalizador. El fraccionamiento de la BLC con disolventes orgánicos es considerado un pre-tratamiento prometedor en comparación con los tratamientos convencionales porque supone el fraccionamiento y recuperación de los tres componentes mayoritarios de la BLC. Promueve la eliminación de la fracción de hemicelulosas, lo que ayuda a la deslignificación del material, gracias a la ruptura de los enlaces lignina-

polisacáridos; de esta forma se hace posible la recuperación de una fracción sólida de celulosa de alta pureza y con una digestibilidad enzimática mejorada, la recuperación de una fracción líquida rica en hemicelulosas y lignina (con alto grado de pureza) que puede ser recuperada mediante precipitación, además de la recuperación de los disolventes orgánicos utilizados.

El estudio se realizó sobre dos materias primas diferentes: PT y cardo, por si hubiera diferencias asociadas a la materia prima. En primer lugar, se determinó la composición química de las materias primas, de acuerdo con los procedimientos formulados por el Laboratorio Nacional de Energía Renovable (NREL, “National Renewable Energy Laboratory”), debido a que puede variar respecto a las reportadas en la bibliografía por factores como el clima, las condiciones de crecimiento, los fertilizantes utilizados, etc. De esta forma, se puede evaluar el efecto del pre-tratamiento en las materias primas, al comparar estos resultados con las caracterizaciones químicas de los materiales sólidos obtenidos.

Los parámetros del pre-tratamiento EW deben ser fijados para maximizar el rendimiento de glucosa en la posterior sacarificación enzimática, todo ello aportando la menor energía posible. Para este propósito, la influencia del tiempo de reacción (min), la temperatura (°C), la relación líquido/sólido (L/S) (L/Kg) y el contenido de etanol (v/v) en el licor se optimizaron a través de un diseño de experimentos tipo Taguchi (L_9) (Tabla 4). El cual, por medio de matrices ortogonales, organiza las variables y sus niveles de la manera más probable que afecten el proceso, y mediante el cálculo de una relación señal/ruido (S/N), basada en los datos experimentales obtenidos, define las mejores condiciones experimentales dentro del intervalo experimental probado. En este trabajo, se considera la relación S/N: mayor-mejor. Este tipo de diseño tiene la ventaja de permitir reducir el número de experimentos, ahorrando tiempo y recursos.

Además, la metodología Taguchi permite construir los denominados gráficos de efectos principales, que determinan los niveles de factor óptimos para cada variable-respuesta. Cuanto mayor sea la relación S/N, mejor será la respuesta. Finalmente, se realiza una prueba de confirmación, para evaluar la veracidad de las condiciones encontradas.

Tabla 4. Asignación de los factores y sus niveles mediante una matriz de diseño L₉.

Experimento	Factor A: Tiempo (min)	Factor B: Temperatura (°C)	Factor C: Relación L/S (L/kg)	Factor D: Etanol (v/v)
T1	60	150	20	0,25
T2	60	170	25	0,33
T3	60	190	30	0,50
T4	90	150	25	0,50
T5	90	170	30	0,25
T6	90	190	20	0,33
T7	120	150	30	0,33
T8	120	170	20	0,50
T9	120	190	25	0,25

Los experimentos se realizaron en un reactor de 6 L de capacidad, agregando el equivalente a 100 g de materia prima seca. Los materiales pre-tratados fueron filtrados al vacío para obtener una fracción líquida y una fracción sólida, que es lavada con abundante agua para retirar los compuestos de degradación que se pudieran haber formado durante el fraccionamiento y, posteriormente, homogenizada durante 5 min en un desintegrador de pasta de laboratorio. Finalmente, se pesó el residuo sólido, para determinar la recuperación de sólidos (RS) (ecuación 2, Sección 5 del apartado de Materiales y Métodos) y se realizó la caracterización química de los materiales sólidos obtenidos de acuerdo con los procedimientos establecidos por NREL.

El efecto del pre-tratamiento se midió en términos de recuperación de glucanos (RG), hidrólisis de xilanos (HX), grado de deslignificación (GD) y digestibilidad de la fracción de celulosa a glucosa o hidrólisis enzimática (HE), expresados tal y como se describen en las ecuaciones (3) - (6) del apartado de Materiales y Métodos (Sección 5) de esta Tesis Doctoral.

En todos los experimentos se determinó la cantidad de energía involucrada en el mismo. Para ello, se utilizó como índice el factor H, que considera que la deslignificación está principalmente influenciada por la temperatura de reacción. Su uso se justifica por ser una forma sencilla de englobar las dos variables que afectan al consumo energético del pre-tratamiento de la BLC: tiempo y temperatura.

La calidad de los sólidos pre-tratados se determinó por HE, utilizando un cóctel enzimático comercial, compuesto por Celluclast 1.5L y Novozyme 188. Las condiciones de reacción fueron una consistencia del 10 % (p/v), tampón citrato de sodio, agitación orbital de 150 rpm y 50 °C durante 72 h. Se tomaron muestras a distintos tiempos de reacción, que fueron analizadas mediante Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, “high liquid performance chromatography”) para observar la evolución de la producción de glucosa.

Publicación I: Optimización del fraccionamiento de la paja de trigo mediante una mezcla de etanol-agua y comparación con el pre-tratamiento con ácido sulfúrico diluido

Este trabajo estudia el fraccionamiento de la PT mediante el pre-tratamiento EW catalizado con ácido (1% H_2SO_4). La elección de la PT se fundamenta en su abundancia, ubicuidad y a que anteriormente fue utilizada por la industria como materia prima en la fabricación de pastas semi-químicas.

La caracterización química de la PT indica que la fracción de carbohidratos representa el 65,1 % del peso seco. De esta forma, el contenido de celulosa (representado por el contenido de glucanos) y el contenido de hemicelulosas (representada por el contenido de xilanos) fue del 32,8 % y del 26,3 % de la materia prima, respectivamente. Además, se encontraron pequeñas cantidades de arabinanos (3,6 %) y de grupos acetilo (2,4 %). Al igual que otros cultivos agrícolas de importancia comercial, la PT tiene menor contenido de lignina (13,1 %), pero mayor contenido de extractivos (17,9 %) que las especies madereras, indicando un mayor grado de accesibilidad y, por tanto, de reactividad del complejo de carbohidratos al procesamiento químico. El alto contenido de cenizas (4,1

%) es consistente con la presencia de sílice, un componente mineral importante derivado de la aplicación de fertilizantes en cultivos de biomasa herbácea.

El rendimiento de celulosa del pre-tratamiento EW se expresa como los glucanos retenidos en el sólido (RG), y la calidad de este método de fraccionamiento se mide como la capacidad para obtener valores altos de HX y GD. Finalmente, la accesibilidad al residuo sólido celulósico para ser hidrolizado enzimáticamente a glucosa se mide por medio de la HE. Los valores de estos cuatro parámetros se muestran en la Tabla 5. Se ha comprobado que el pre-tratamiento EW (1% de H_2SO_4) es un buen método para fraccionar la PT, debido a que se obtienen sólidos ricos en celulosa, con altas recuperaciones de glucanos (hasta un 96,1 %). Además, en las condiciones más severas se logra una alta eliminación de hemicelulosas (hasta un 92,7 %) y una deslignificación significativa (hasta un 73,1 %).

Para determinar los posibles efectos de los factores sobre el fraccionamiento de la PT se calculó la media de las relaciones las relaciones S/N (Tabla 5) para cada una de las cuatro respuestas consideradas (RG, HX, GD e HE). Los valores S/N obtenidos muestran que, en el caso de la variable RG, la mayor influencia en la respuesta está dada por el factor C, mientras que las otras respuestas (HX, GD e HE) están influenciadas en mayor grado por el factor B.

Además, los gráficos de efectos principales (Figura 18), permiten determinar el nivel óptimo de cada parámetro para cada variable respuesta. De esta forma, para optimizar el pre-tratamiento en términos de RG, la combinación óptima de los factores es $A_3B_3C_3D_1$. Mientras que para potenciar HX, GD e HE, la condición óptima es $A_3B_3C_3D_2$.

Una vez establecido el efecto relativo de los parámetros y sus niveles óptimos para cada respuesta, se ha determinado si las variaciones observadas son estadísticamente significativas o si podrían atribuirse al error experimental. Para esto, se realizó un ANOVA ($p \leq 0,1$), donde en primer lugar, se determinó el factor de contribución (FC) de cada factor para cada respuesta y se consideró que los que tienen una contribución porcentual superior al 20 % ($\text{FC} > 20 \%$) tienen un efecto significativo en la respuesta. De esta forma, se encontró que para la RG solo los factores C y B tenían una contribución

superior al 20 %; sin embargo, ninguno de estos factores son estadísticamente significativo. Por otro lado, se encontró que para las respuestas HX y HE, el único factor con influencia estadísticamente significativa es el factor B. Finalmente, se determinó que la deslignificación del material está influenciada por los factores B y D. Por lo tanto, de acuerdo con estos resultados, la temperatura (factor B) es el que tiene mayor efecto sobre el pre-tratamiento EW de PT.

Tabla 5. Resultados experimentales y relación señal/ruido para la paja de trigo. El criterio para la selección de los parámetros es el de mayor-mejor.

Experimento	RG	S/N	HX	S/N	GD	S/N	HE	S/N
PT	-	-	-	-	-	-	16,2	-
T1	90,8	39,2	66,7	36,5	38,8	31,8	62,0	35,8
T2	78,8	37,9	84,3	38,5	63,9	36,1	65,3	36,3
T3	89,8	39,1	84,6	38,6	73,1	37,3	75,0	37,5
T4	80,9	38,2	59,5	35,5	47,7	33,6	52,7	34,4
T5	91,3	39,2	83,1	38,4	55,0	34,8	75,2	37,5
T6	91,6	39,2	91,6	39,2	66,6	36,5	79,4	38,0
T7	96,1	39,7	69,9	36,9	51,6	34,3	71,0	37,0
T8	84,3	38,5	79,1	38,0	67,8	36,6	68,9	36,8
T9	89,3	39,0	92,7	39,3	61,6	35,8	78,4	37,9

PT: paja de trigo; **S/N:** relación señal/ruido; **RG:** recuperación de glucanos (%); **HX:** hidrólisis de xilanos (%); **GD:** grado de deslignificación (%); **HE:** hidrólisis enzimática (%).

La metodología Taguchi permite encontrar las condiciones óptimas de pre-tratamiento para cada respuesta. Cuando, como en este caso, existen cuatro respuestas, en primer lugar se debe determinar, cual es la respuesta de mayor interés en el proceso. Debido a

que el objetivo del pre-tratamiento es acondicionar la BLC para obtener el mayor rendimiento en glucosa, se ha considerado la HE como la respuesta más importante. Y, tal y como se acaba de describir, solo es afectada por la temperatura del pre-tratamiento. Por lo que se determinó que la condición óptima para PT es: $A_1B_3C_1D_1$; es decir, con la temperatura en el máximo valor del rango estudiado y el resto de variables en sus valores mínimos.

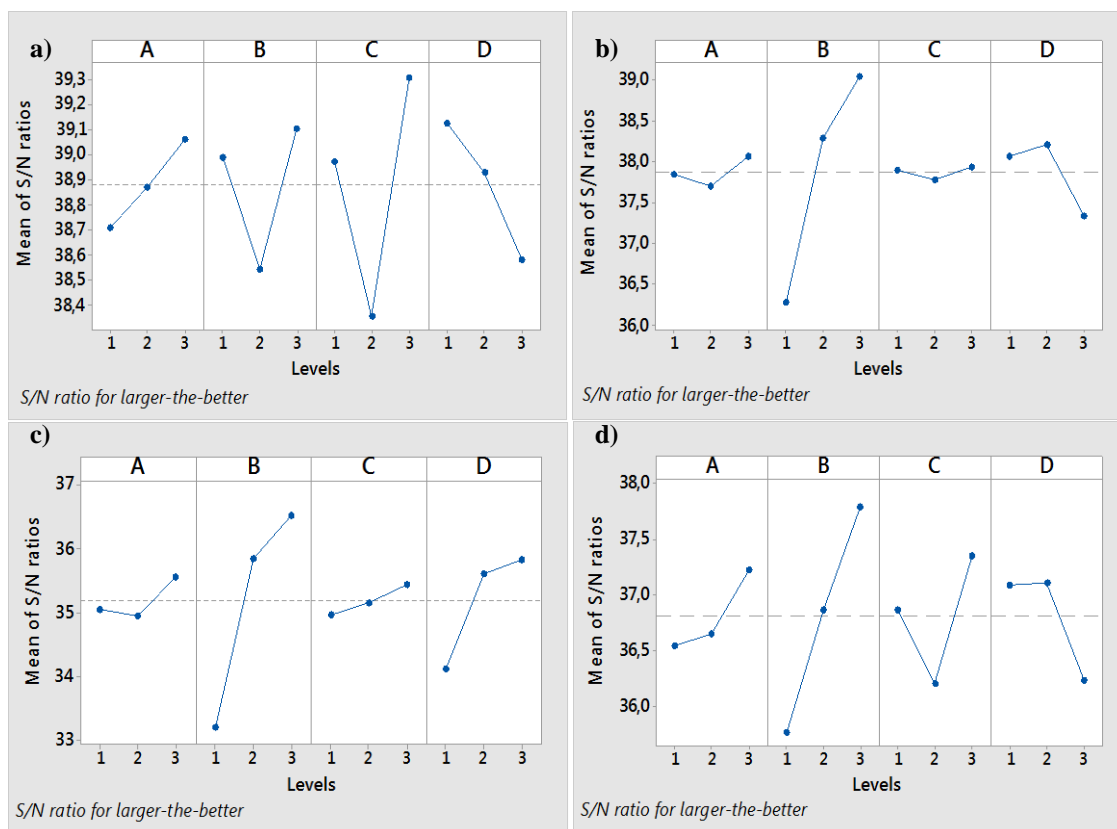


Figura 18. Gráficos de efectos principales para las relaciones S/N (mayor-mejor) para el fraccionamiento de la paja de trigo. (a) RG; (b) HX; (c) GD y (d) HE. **A:** tiempo; **B:** temperatura; **C:** relación L/S; **D:** contenido de etanol.

A continuación, se realizó el experimento de confirmación (por duplicado) con las condiciones encontradas como óptimas para comparar los resultados experimentales con los predichos por el diseño Taguchi. La comparación (Tabla 6) no mostró diferencias estadísticamente significativas entre el modelo experimental y el previsto. No obstante, las condiciones óptimas no explican bien la respuesta GD, lo que puede deberse al hecho de que esta respuesta también se ve influenciada por el contenido de etanol (factor D). Es

por esto que, para trabajos posteriores con PT, se ha fijado la relación L/S y el tiempo de reacción en sus niveles más bajos (20 L/kg y 60 min, respectivamente), el contenido de etanol en su nivel intermedio (0,33 v/v) y la temperatura en su nivel mayor (190 °C).

Tabla 6. Resultados de la prueba de confirmación del fraccionamiento de la paja de trigo y comparación con los valores predichos.

Experimento		RG	S/N	HX	S/N	GD	S/N	HE	S/N
Gráficos de efectos principales: A₃B₃C₃D₂	Predicho	97,1	39,8	94,1	39,6	72,6	37,6	86,7	39,1
	Experimental	96,0	39,7	91,4	39,2	72,2	37,2	83,4	38,4
ANOVA: A₁B₃C₁D₁	Predicho	91,8	39,3	91,0	39,2	59,9	35,1	77,7	37,9
	Experimental	92,7	39,3	88,0	38,9	58,3	35,3	80,7	38,1

RG: recuperación de glucanos (%); **HX:** hidrólisis de xilanos (%); **GD:** grado de deslignificación (%); **HE:** hidrólisis enzimática (%); **S/N:** relación señal/ruido.

Finalmente, una vez fijadas las condiciones de operación para los factores C y D (relación L/S y el contenido de etanol), se realizaron varios pre-tratamientos para compararlas con el pre-tratamiento DSA. En estos ensayos, la cantidad de energía involucrada en el fraccionamiento (representada por el factor H) así como los resultados obtenidos serán comentados en la Publicación III, junto con los resultados obtenidos para cardo y RM.

Publicación II: Optimización del fraccionamiento de *Cynara Cardunculus L.* mediante una mezcla de etanol-agua

A raíz de los resultados obtenidos para PT (Publicación I), se planteó explorar la posibilidad de emplear el pre-tratamiento con mezclas de etanol-agua en la valorización de los tallos cardo. El cardo es una planta perenne totalmente adaptada a los ecosistemas con estrés hídrico, grandes variaciones de temperatura y suelos pedregosos e improductivos comunes en los países mediterráneos, por lo que es una buena opción para

aumentar la biomasa disponible en zonas poco fértiles. Además, la alta productividad de la biomasa, su composición química y su baja humedad (una ventaja evidente para su transporte, almacenamiento y conservación) hacen del cardo una materia prima muy atractiva para los esquemas de biorrefinería lignocelulósica.

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar y optimizar el pre-tratamiento EW de cardo, utilizando 1 % de H_2SO_4 como catalizador, para maximizar el rendimiento de glucosa en la posterior etapa de sacarificación enzimática. En paralelo se pretende la recuperación y valorización de las fracciones de hemicelulosas y lignina, evitando un consumo excesivo de energía. Para este propósito, la influencia del tiempo, la temperatura, la relación L/S y el contenido de etanol (factores A, B, C y D, respectivamente) se evaluaron a través de la metodología Taguchi (L_9) (Tabla 4).

Al igual que en el trabajo anterior, se inició el estudio con la caracterización de la materia prima para establecer la referencia y luego determinar los efectos del pre-tratamiento en los tallos de cardo, los que nuevamente se expresaron a través de las variables respuesta: RS, RG, HX, GD e HE. Los resultados indicaron que los carbohidratos representan el 53,1 % del peso seco de los tallos de cardo. El contenido de celulosa (representado por el contenido de glucanos) y el contenido de hemicelulosas (representado por el contenido de xilanos) fueron del 33,3 % y del 16,2 % de la materia prima, respectivamente. Además, se encontraron pequeñas cantidades de arabinosa (< 1 %) y de grupos acetilo (3,2 %), así como un alto contenido de cenizas (6,5 %) y de extractivos (19,0 %).

Los resultados de RS varían entre 49,8 % y 71,5 %, donde los experimentos realizados a 190 °C, la temperatura más alta probada, arrojaron los valores de SR más bajos; es decir, presentaron una mayor solubilización de los componentes principales de la materia prima. La caracterización química de los materiales sólidos obtenidos en este estudio (ver Tabla 7) muestran que este tipo de pre-tratamiento, aplicado a los tallos de cardo, permite la obtención de sólidos pre-tratados con unas características químicas muy diferentes, relacionadas con las distintas condiciones evaluadas. Sin embargo, todos ellos presentaron una alta recuperación de la fracción de glucanos (87,8-98,0 %). Por otro lado, la fracción de hemicelulosas, muy reactiva en este tipo de pre-tratamientos, presentó una amplia variación en su eliminación (entre un 16,2 % y 87,6 %). Además, la eliminación

de los xilanos se produce en paralelo con la deslignificación, que varía de 38,9 % a 64,9 %.

Tabla 7. Resultados experimentales y relación señal/ruido (S/N) obtenidos para los tallos *Cynara Cardunculus L.* El criterio para la selección de los parámetros es el de mayor-mejor.

Experimento	RG	S/N	XH	S/N	GD	S/N	HE	S/N
cardo	-		-		-		10,4	
T1	92,7	39,4	16,2	24,2	39,8	32,0	37,4	31,5
T2	98,0	39,8	60,9	35,7	47,5	33,5	62,6	35,9
T3	96,2	39,7	69,2	36,8	64,9	36,2	68,0	36,7
T4	87,9	38,9	20,6	26,3	38,9	31,8	34,3	30,7
T5	92,8	39,4	71,7	37,1	49,7	33,9	68,8	36,8
T6	94,3	39,5	86,6	38,8	58,4	35,3	83,1	38,4
T7	87,8	38,9	43,1	32,7	44,6	33,0	47,0	33,5
T8	93,1	39,4	46,4	33,3	53,5	34,6	64,9	36,3
T9	88,8	39,0	87,6	38,9	60,2	35,6	80,3	38,1

cardo: *Cynara Cardunculus L.*; **S/N:** relación señal/ruido; **RG:** recuperación de glucanos (%); **HX:** hidrólisis de xilanos (%); **GD:** grado de deslignificación (%); **HE:** hidrólisis enzimática (%).

Es bien sabido que la eliminación de hemicelulosas y lignina favorece los rendimientos de la HE. En consecuencia, se realizaron ensayos de digestibilidad como prueba de calidad de los sólidos obtenidos, en términos de accesibilidad a la fracción de celulosa. Los resultados obtenidos revelaron diferencias importantes asociadas a la eliminación de la matriz hemicelulosa-lignina (Tabla 7), debido a que la producción de glucosa varía entre un mínimo de 34,3 % (T4), sólido obtenido en condiciones que minimizan la HX y el GD, y entre un máximo de 83,1 % (T6) en condiciones en las que se produce un sólido en el que se maximizan la HX y el GD. Esto significa que la capacidad de la fracción

celulósica para transformarse en glucosa aumenta aproximadamente en un 700 % después del pre-tratamiento del cardo original (10,4 %). Estos resultados confirman que el pre-tratamiento EW mejora la conversión de la fracción de celulosa debido al efecto combinado de la deslignificación y de la solubilización de las hemicelulosas. Se evidencia que los mayores valores de HX, GD e HE se logran en los materiales pre-tratados utilizando la máxima temperatura de reacción evaluada en este trabajo (190 °C).

Sin embargo, es necesario determinar cuál de los cuatro factores evaluados tiene un efecto significativo en los resultados obtenidos. Con este fin, se calculó la media de las relaciones S/N (Tabla 7), en los tres niveles de cada factor (A, B, C y D) y para cada variable respuesta considerada. Los resultados mostraron que el factor que ejerce mayor influencia en RG es A, seguida de B, C y D. Por otro lado, para HX, GD e HE, el factor B siempre tuvo el efecto más importante, mientras que solo se observaron efectos moderados de los factores A, C y D. Las variaciones de la relación S/N encontradas para RG, son mucho más bajas que las observadas para las otras tres respuestas, lo cual es coherente con las pequeñas variaciones observadas en la recuperación de glucanos.

Además, los gráficos de efectos principales (Figura 19), que determinan los niveles óptimos de cada factor en cada variable respuesta, mostraron que la condición óptima para GR es **A₁B₂C₁D₂**, mientras que para GD es **A₃B₃C₃D₃** y para HX e HE es **A₃B₃C₃D₂**.

Una vez determinado el efecto de las variables de entrada en las cuatro respuestas, es necesario establecer si las variaciones son estadísticamente significativas. Para observar la importancia práctica y estadística de los factores en el pre-tratamiento, se determinó el FC de cada factor, considerando que una contribución mayor al 10 % afecta a la respuesta y se realizó un ANOVA con un nivel de confianza del 95 % ($p \leq 0,05$). En el caso de la RG, los factores con $FC > 10\%$ son A y B, ambos estadísticamente significativos. Por otro lado, el factor B es el único que afecta a HX, GD e HE, con resultados estadísticamente significativos. Finalmente, la contribución del error combinado es relativamente pequeña para las respuestas RG, GD y HE, indicando que la mayor parte de las variaciones se explican por el enfoque Taguchi. Sin embargo, para la HX, el error combinado es de un 17,4 %, lo que indica que la temperatura, única variable con efecto significativo, deja sin explicar una parte importante de la variación en esta respuesta.

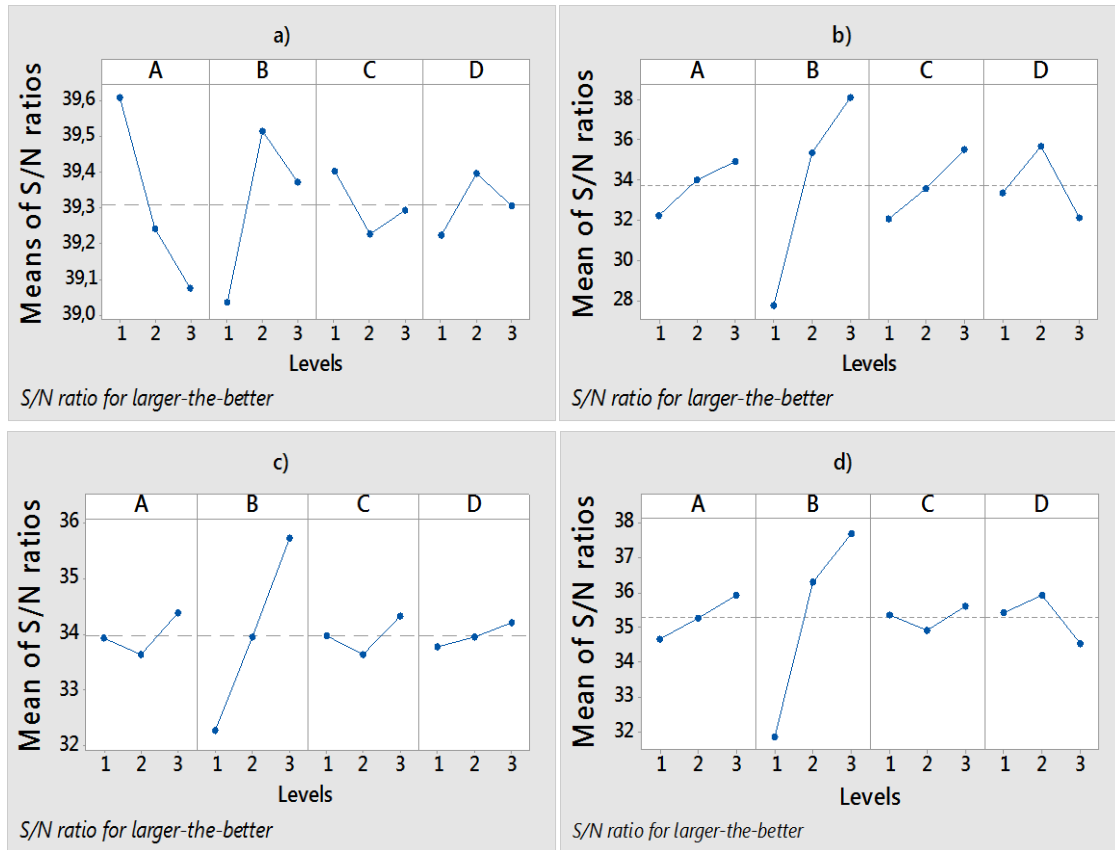


Figura 19. Gráficos de efectos principales para las relaciones S/N (mayor-mejor) para el fraccionamiento de los tallos *Cynara Cardunculus L.* (a) RG; (b) HX; (c) GD y (d) HE. A: tiempo; B: temperatura; C: relación L/S; D: contenido de etanol.

Sobre la base de los resultados de ANOVA, la única variable del pre-tratamiento EW (con H_2SO_4 como catalizador) de los tallos de cardo, que influye en las respuestas es la temperatura de reacción (B), con la excepción de RG que está influenciada por el tiempo de reacción (A) y la temperatura (B) (si bien las variaciones en esta respuesta son pequeñas). El método de Taguchi es adecuado para optimizar una variable respuesta, pero no es tan adecuado para la optimización de múltiples respuestas. En este caso, la HE ha sido considerada como la principal respuesta de salida, debido a que está directamente relacionada con el rendimiento en glucosa del material celulósico obtenido con el fraccionamiento. Teniendo en cuenta el análisis ANOVA, solo la temperatura tiene un efecto positivo en HE, por lo que el resto de las variables se han mantenido en su nivel más bajo para minimizar la energía asociada a los altos niveles de las variables. Las condiciones óptimas para maximizar la HE son $\mathbf{A_1B_3C_1D_1}$.

Queda ahora verificar si las condiciones determinadas por la metodología Taguchi son las óptimas para el pre-tratamiento del cardo, por lo que se realizaron dos nuevos pre-tratamientos con las variables en estos valores óptimos y se compararon los valores experimentales y los pronosticados para RG, HX, GD e HE (Tabla 8). Se puede observar que las condiciones de fraccionamiento se mejoran enormemente al aplicar la metodología de optimización Taguchi, y que el modelo es capaz de predecir con precisión las respuestas del fraccionamiento de los tallos de cardo, bajo las condiciones estudiadas en este trabajo.

Tabla 8. Resultados de la prueba de confirmación del fraccionamiento de *Cynara Cardunculus L.* y comparación con los valores predichos.

Experimento	RG	S/N	HX	S/N	GD	S/N	HE	S/N
A₁B₃C₁D₁ (Experimental)	97,6	39,8	68,6	36,7	58,8	35,4	71,8	37,1
A₁B₃C₁D₁ (Predicho)	96,4	39,7	70,7	34,6	59,9	35,5	74,9	37,3

RG: recuperación de glucanos (%); **HX:** hidrólisis de xilanos (%); **GD:** grado de deslignificación (%); **HE:** hidrólisis enzimática (%); **S/N:** relación señal/ruido.

3.2. Comparación entre el pre-tratamiento con una mezcla de etanol-agua y el pre-tratamiento con ácido sulfúrico diluido

En este apartado se exponen los resultados obtenidos al fraccionar mediante el pre-tratamiento EW tres materias primas diferentes: PT, tallos de cardo y RM. Además, se comparan con los resultados obtenidos al aplicarles el pre-tratamiento DSA, utilizando niveles de energía similares.

Publicación III: Comparativa del pre-tratamiento de tres biomásas lignocelulósicas mediante una mezcla de etanol-agua y la comparación con el pre-tratamiento con ácido sulfúrico diluido

Una biorrefinería basada en materias primas de origen lignocelulósico busca producir productos químicos valiosos y biocombustibles mediante procesos que puedan llegar a ser rentables. La utilización de múltiples materias primas es una posible estrategia para reducir los costos, por el mayor factor de escala, además de permitir la utilización de biomasa concentrada en un área específica, reduciendo el coste del transporte. Por lo tanto, se logra maximizar el uso de recursos lignocelulósicos en la región, reducir costos en la biorrefinería y agregar valor a las economías rurales. Sin embargo, se espera que diferentes materiales tengan diferentes respuestas a los pre-tratamientos, debido a que la matriz de hemicelulosas-lignina que rodea las micro-fibrillas de celulosa y la presencia de regiones cristalinas en la celulosa, pueden variar significativamente entre las diferentes biomásas, afectando a su rendimiento en la etapa de digestibilidad enzimática.

Por este motivo, el objetivo de este trabajo fue evaluar el fraccionamiento, con bajo consumo de energía, de tres materias primas mediante dos pre-tratamientos diferentes: EW y DSA. Ambos pre-tratamientos buscan mejorar la digestibilidad enzimática de la celulosa, sin embargo, actúan de manera diferente. EW actúa hidrolizando las hemicelulosas y disolviendo la lignina, mientras que DSA promueve, principalmente, la hidrólisis de las hemicelulosas.

Una vez optimizadas las condiciones del pre-tratamiento EW (Publicaciones I y II); fijada la relación líquido/sólido (L/S) y el contenido de etanol del licor en 20 kg/L y 0,33 %, respectivamente, PT, cardo y RM fueron fraccionados mediante el pre-tratamiento EW, catalizado con 1 % de H₂SO₄ (sobre biomasa) y, alternativamente, con una solución DSA (1 % H₂SO₄ sobre biomasa). A continuación, se midieron las cantidades de sólido celulósico producido y sus aptitudes para ser hidrolizados enzimáticamente a glucosa con el menor gasto energético posible. Las variables a evaluar fueron tiempo y temperatura de reacción, que se variaron para obtener una amplia gama de consumos de energía (factor H) (Tabla 9).

En el caso de PT, estas pruebas también formaron parte de un trabajo anterior (Publicación I) del que parte de sus datos se han incluido en este estudio para fines de comparación. Los residuos sólidos y los licores obtenidos se analizaron (NREL) para determinar las composiciones en carbohidratos y en lignina, y de esta forma, evaluar el efecto de cada pre-tratamiento en cada materia prima en términos de RS, RG, HX, GD e HE. Además se valuó la hidrólisis de arabinanos (HA), eliminación de grupos acetilos (EGA).

La caracterización química de las materias primas empleadas indica que los carbohidratos son los principales componentes, representando el 51,9 %, 53,2 % y 65,1 % (p/p) del RM, del cardo y de la PT, respectivamente. Siendo la celulosa, aproximadamente un tercio del peso seco de los tres materiales, mientras que las hemicelulosas (principalmente xilanos) representan un 20 % del cardo y del RM, y un 32 % de la PT. Al igual que otras plantas herbáceas, estos tres materiales tienen bajo contenido de lignina, lo que implica un mejor acceso de las enzimas y productos químicos a los carbohidratos estructurales.

Tabla 9. Condiciones de pre-tratamientos con mezclas de etanol-agua y con ácido sulfúrico diluido.

Experimento	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Factor H	Experimento
EW1	130	60	26	DSA1
EW2	150	45	132	DSA2
EW3	150	60	173	DSA3
EW4	160	45	316	DSA4
EW5	170	60	958	DSA5
EW6	170	90	1417	DSA6

EW: pre-tratamiento con mezclas de etanol-agua; **DSA:** pre-tratamiento con ácido sulfúrico diluido.

Como se esperaba, la RS (ver Figura 20) disminuye a medida que aumenta la entrada de energía, debido a la intensa eliminación de los componentes no celulósicos. Sin embargo, se pueden observar diferencias entre los tres materiales estudiados. Al aplicar los pre-tratamientos más severos (mayor factor H) los rendimientos fueron del 40-45 %, 45-50 % y 55-60 % para el RM, la PT y el cardo, respectivamente, independientemente del tipo de pre-tratamiento (DSA o EW) se obtienen valores de RS similares en todo el rango de factores H.

La mayor parte de la celulosa es retenida en la fracción sólida, con pequeñas variaciones cuando aumenta la energía invertida en el pre-tratamiento. Se encontró que la RG (Figura 21) es similar para EW y DSA en los tres materiales evaluados y, como era de esperar, las principales diferencias se encuentran al comparar las materias primas; así, el cardo mostró el mejor comportamiento, debido a que retiene entre el 92,0 % y el 97,3 % de los glucanos en la fracción sólida; la PT entre el 88,0 % y el 93,4 % de dichos glucanos; mientras que el RM solo alcanza valores en el intervalo del 56,0 % al 63,0 %, lo que afecta a la aptitud de este material para transformarse en glucosa.

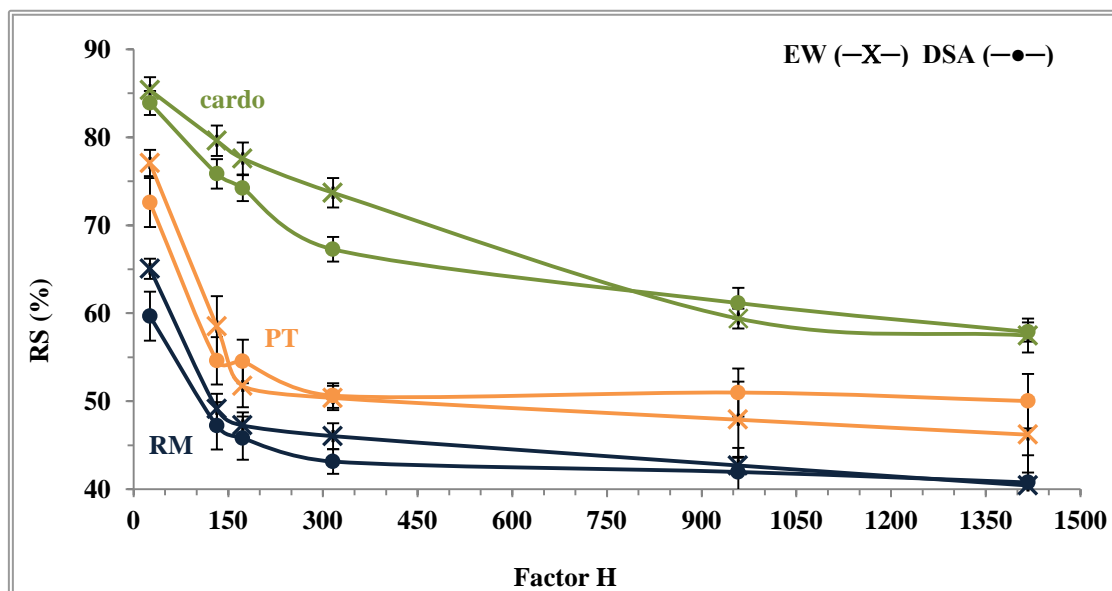


Figura 20. Recuperación de sólidos (RS, %) para la paja de trigo (PT), los tallos de *Cynara Cardunculus L.* (cardo) y el rastrojo de maíz (RM), en función del factor H, para los pre-tratamientos con mezclas de etanol-agua (EW) (—X—) y con ácido sulfúrico diluido (DSA) (—●—).

Para ambos métodos de fraccionamiento, los valores de HX (ver Figura 22) aumentan a medida que aumenta el aporte de energía, sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre los materiales. Para el RM, se logró una HX máxima del 77,8 % con DSA y del 70,0 % con EW. Con la PT el resultado fue de un 87,4 % con DSA y un 83,7 % con EW. Por el contrario, en el caso del cardo, solo se alcanzó un 66,2 % de HX, en las condiciones más intensas de DSA, y solo el 53,2 % con EW, lo que sugiere una menor accesibilidad de este material para las enzimas que catalizan la hidrólisis. La alta reactividad de la fracción de hemicelulosas con ambos pre-tratamientos, puede deberse a que ambos incorporan 1 % (p/p) de H_2SO_4 , que se suma al ácido acético generado a partir de los grupos acetilo unidos a hemicelulosas.

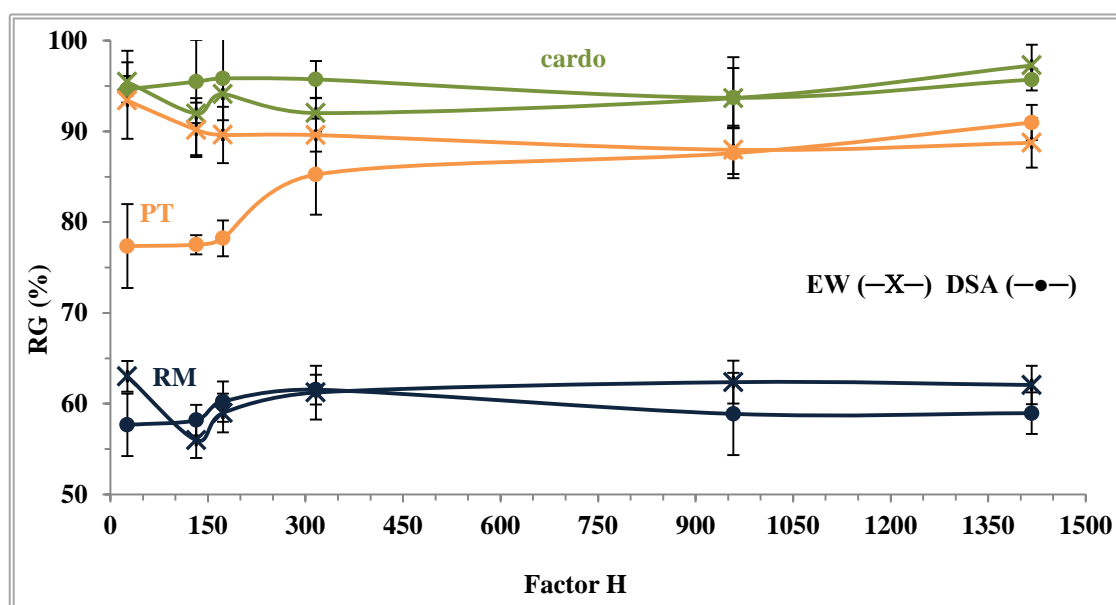


Figura 21. Recuperación de glucanos (RG, %) para la paja de trigo (PT), los tallos de *Cynara Cardunculus L.* (cardo) y el rastrojo de maíz (RM), en función del factor H, para los pre-tratamientos con mezclas de etanol-agua (EW) (—X—) y con ácido sulfúrico diluido (DSA) (—●—).

Por otro lado, el tratamiento EW es más eficiente para eliminar la lignina, mostrando un aumento continuo del GD a medida que aumenta el aporte de energía (Figura 23). La capacidad de un disolvente para disolver lignina aumenta a medida que sus parámetros de solubilidad (δ , parámetro de Hildebrand) se aproximan a un valor de $11 \text{ (J/cm}^3\text{)}^{-1/2}$, que

es el valor aproximado para la lignina. La razón para el mejor comportamiento de EW es la mayor afinidad de los fragmentos de lignina hidrófobos con este medio, en contraste con la solución de H_2SO_4 hidrófila. Otro dato destacable son las diferencias en esta respuesta encontradas entre los diferentes materiales estudiados. El RM y los tallos de cardo mostraron un comportamiento similar, con un máximo GD en torno al 50 % en las condiciones más intensas de EW (factor 1417). Por el contrario, las condiciones de la DSA solo eliminan entre el 8 % y el 20 % de la lignina, con un máximo GD del 16 % para el RM y del 20 % para los tallos de cardo. Este comportamiento sugiere que, bajo las condiciones de DSA, parte de la lignina disuelta se vuelve a precipitar en la superficie de las fibras y este fenómeno es más intenso en las condiciones de pre-tratamiento más severas. La PT mostró una mejor respuesta a ambos pre-tratamientos; con aportes bajos de energía, EW produce un sólido bien deslignificado (GD entre el 60 % y el 66 %), mientras que con DSA se obtuvieron GD entre el 30 % y el 35 %.

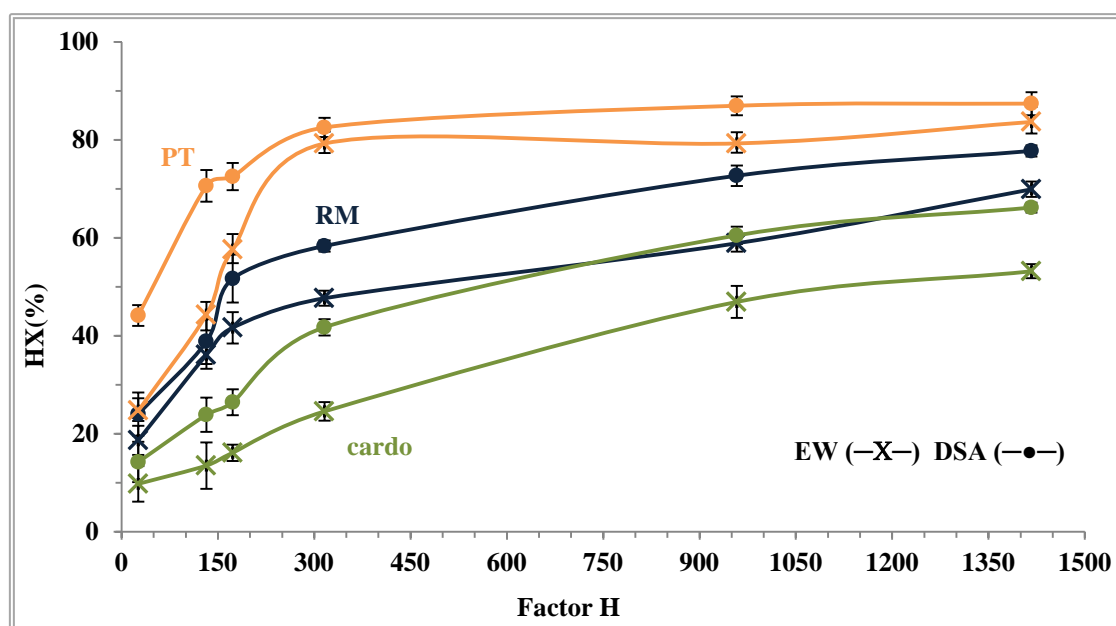


Figura 22. Hidrólisis de xilanos (HX, %) para la paja de trigo (PT), los tallos de *Cynara Cardunculus L.* (cardo) y el rastrojo de maíz (RM), en función del factor H, para los pre-tratamientos con mezclas de etanol-agua (EW) (—X—) y con ácido sulfúrico diluido (DSA) (—●—).

Finalmente, con el fin de comparar la calidad de los sólidos obtenidos por ambos tipos de tratamientos (EW y DSA) se determinó la conversión de celulosa en glucosa mediante sacarificación enzimática. La figura 24 muestra la conversión a glucosa alcanzada después de 72 h para todos los materiales pre-tratados estudiados. Al comparar ambos pre-tratamientos, se encontró que ambos mejoran la digestibilidad enzimática de la celulosa, aunque el resultado global es que EW proporciona un rendimiento de HE más alto en el amplio intervalo de consumos de energía estudiados, mientras que, en el caso del cardo, ambos pre-tratamientos dan un rendimiento similar.

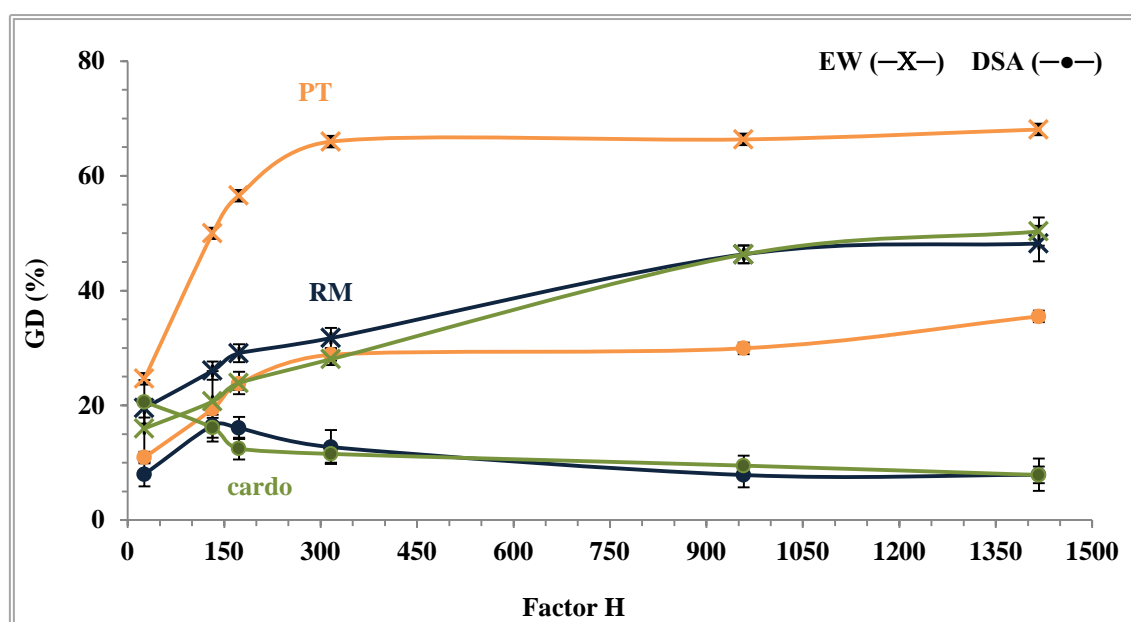


Figura 23. Grado de deslignificación (GD, %) para la paja de trigo (PT), los tallos de *Cynara Cardunculus L.* (cardo) y el rastrojo de maíz (RM), en función del factor H, para los pre-tratamientos con mezclas de etanol-agua (EW) (—X—) y con ácido sulfúrico diluido (DSA) (—●—).

En resumen, los resultados han demostrado que EW es más selectivo para fraccionar la lignocelulosa que DSA, y tiene requerimientos de energía moderados (160 °C de temperatura durante 45 min, un factor H de 415). El método EW produce un sólido rico en celulosa que es más fácil de hidrolizar a glucosa, elimina más lignina y es solo un poco menos eficiente para hidrolizar los xilanos. La comparación entre sustratos lignocelulósicos presenta diferencias significativas entre ellos. La PT es el mejor material

para producir glucosa (rendimiento del 80 %) en condiciones moderadas. El RM y el cardo no son tan eficientes, por lo que se debe hacer un estudio cuidadoso de los recursos de lignocelulosa disponible y de sus requerimientos de pre-tratamiento antes de proyectar una biorrefinería.

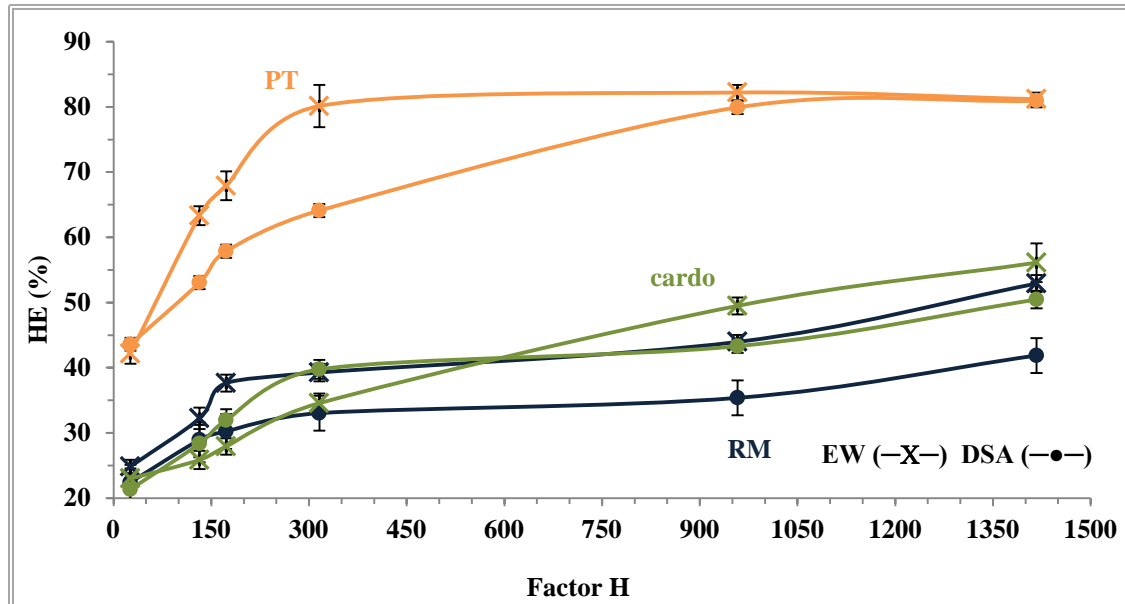


Figura 24. Rendimiento de la hidrólisis enzimática (HE, %) para la paja de trigo (PT), los tallos de *Cynara Cardunculus L.* (cardo) y el rastrojo de maíz (RM), en función del factor H, para los pre-tratamientos con mezclas de etanol-agua (EW) (—X—) y con ácido sulfúrico diluido (DSA) (—●—).

3.3. Mejora de la sostenibilidad ambiental del proceso

En este apartado se propone una alternativa al proceso de pre-tratamiento EW de la PT que ha sido estudiado en los primeros trabajos publicados, con el objetivo de mejorar la sostenibilidad ambiental y económica del proceso.

Publicación IV: Re-utilización del licor de pre-tratamiento de paja de trigo con mezclas etanol-agua

Uno de los principales cuellos de botella de la etapa de pre-tratamiento para el aprovechamiento de la BLC está relacionado con los costos asociados a la recuperación

del disolvente y a la concentración de los productos con valor añadido recuperados en el licor, lo que afecta al coste total del proceso. En la literatura, se pueden encontrar diversos estudios para abordar este problema. Por ejemplo, disminuir la relación L/S, mejorar estrategias de recuperación, usar líquidos iónicos en vez de agua, aumentar la eficiencia del uso de masa/energía mediante la implementación de un enfoque de diseño jerárquico que involucra la integración de masa y energía, etc.

En este trabajo se ha propuesto, una vez establecidas las condiciones óptimas de fraccionamiento EW de la PT, la estrategia de reutilización del licor del pre-tratamiento, con el objetivo de mejorar la rentabilidad del proceso. Esta estrategia ha sido poco explorada, por lo que la capacidad de hidrólisis del licor reutilizado y la calidad de los sólidos resultantes en términos de digestibilidad enzimática es incierta.

Como se ha observado en la Publicación I, al optimizar las condiciones de pre-tratamiento EW de la PT (60 min, 160 °C, relación L/S de 20 L/kg y 0,33 % (v/v) de etanol; factor H de 415) se logra un alto grado de hidrólisis de la fracción de hemicelulosas y una alta deslignificación, obteniéndose un sólido rico en celulosa con una excelente digestibilidad enzimática (cerca al 80 %). Se ha estudiado la posibilidad de re-utilización del disolvente mediante experimentos en los que se utilizan hasta seis pre-tratamientos, en condiciones óptimas, donde después del primero (realizado con licor fresco) se ha recuperado el licor (L1), que se ha analizado mediante HPLC y se ha mezclado con un volumen adicional de mezcla fresca (para compensar las pérdidas) y, finalmente, se ha utilizado como medio de cocción para el segundo pre-tratamiento. Procediendo de la misma manera, se han realizado cinco cocciones adicionales, en las que los licores de reacción han sido los licores de la cocción precedente lo que en el texto que sigue constituyen los licores L2 a L6.

Por otro lado, los sólidos pre-tratados (S1 a S6) fueron secados al aire hasta obtener una humedad constante y después se caracterizaron químicamente (NREL) para medir el efecto del pre-tratamiento y el efecto del re-uso del licor sobre su composición y calidad. Para ello, se determinó: RS, RG, HX, HA, EGA, GD e HE.

Los resultados de RS y su composición se muestran en la Figura 25. Como hechos más relevantes, se observa que el contenido en sólidos disminuyó hasta un 42,6 % en el quinto re-uso del licor de pre-tratamiento (S6). La recuperación de glucanos desciende sensiblemente hasta el 70,1 % al final de la serie (S6). Por otra parte, la eliminación de hemicelulosas (HX y HA) y lignina (GD) no se ven afectadas por la reutilización sucesiva del licor, lo que parece deberse a que se encuentran en su límite, como se demostró en la Publicación I, donde se observó que, a partir de un factor H cercano a 400, apenas se producían variaciones importantes en estos parámetros. Además, se encontró un aumento continuo en la EGA en las tres primeras reutilizaciones sucesivas, estabilizándose entre el 0,2 % y el 0,3 % para las dos últimas reutilizaciones.

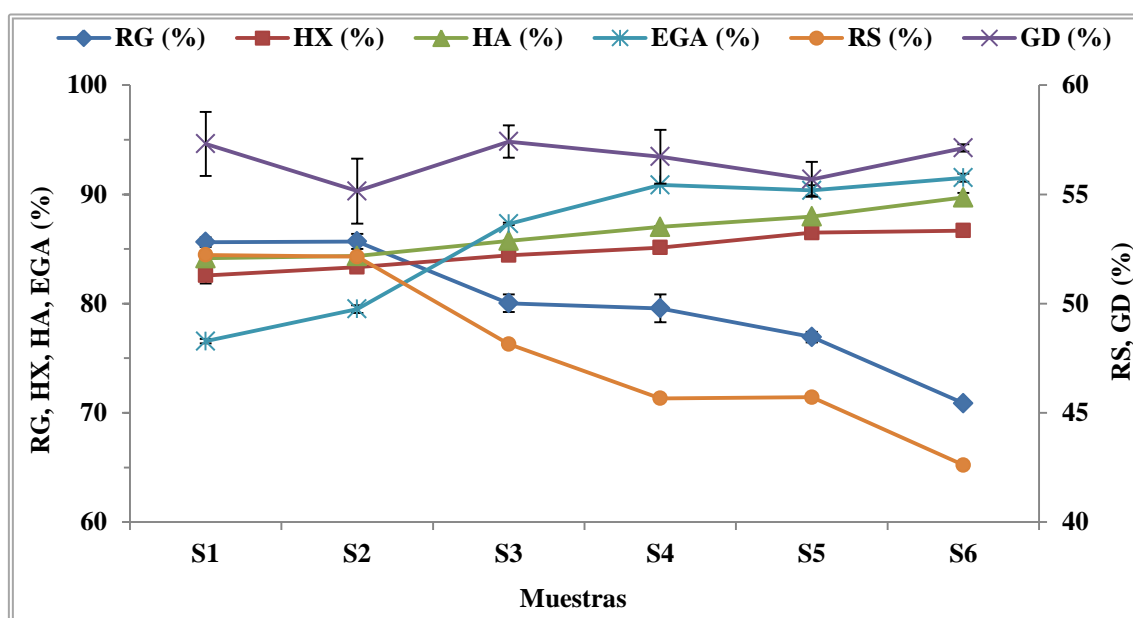


Figura 25. Efecto de la reutilización del licor sobre la recuperación de sólidos y sobre su composición. Recuperación de sólidos (RS, %), recuperación de glucanos (RG, %), hidrólisis de xilanos (HX, %), hidrólisis de arabinanos (HA, %), eliminación de grupos acetilos (EGA, %) y grado de deslignificación (GD, %).

Además, se realizó el análisis de las características estructurales de la materia prima y de los sólidos pre-tratados (S1-S6), mediante espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR, “Fourier transform infrared spectroscopy”), difracción de rayos X (DRX) y microscopía electrónica de barrido (SEM, “scanning electron microscopy”).

El análisis FT-IR (Figura 26), llevado a cabo para identificar los cambios en los grupos funcionales causados por el pre-tratamiento, informa de que la banda atribuida al enlace β -(1-4)-glicosídico (896 cm^{-1}), pico de absorción característico de la celulosa, muestra una gran intensidad en los sólidos pre-tratados, debido a que el contenido de celulosa aumenta después del pre-tratamiento. De manera similar, la banda a 3350 cm^{-1} , asociada con el estiramiento de O-H a partir de los enlaces de hidrógeno de la celulosa, y también la banda a 2900 cm^{-1} , atribuida al estiramiento de C-H dentro del metileno de la celulosa se incrementa de un pre-tratamiento al siguiente. Por otro lado, el estiramiento de los anillos aromáticos de la lignina en la PT está representado por los picos a 1507 y 1436 cm^{-1} . La intensidad de estos picos aumenta, debido posiblemente a la reposición de lignina en la superficie de los sólidos.

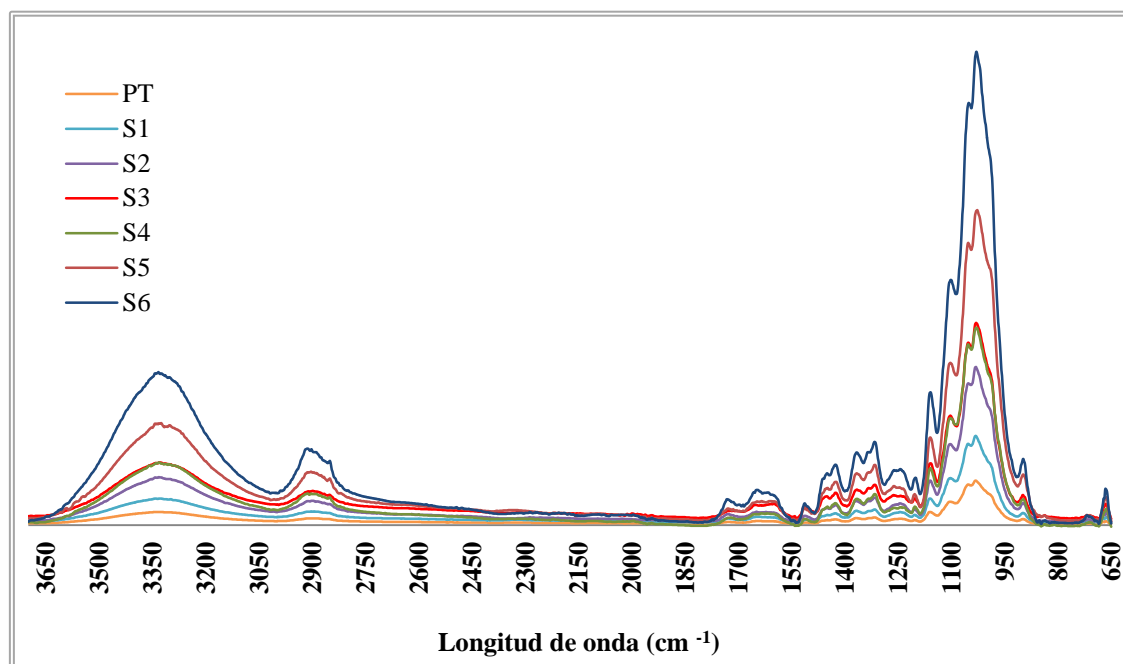


Figura 26. Espectros obtenidos mediante espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR, “Fourier transform infrared spectroscopy”). **PT:** paja de trigo (sin pre-tratar); **S1 a S6:** sólidos pre-tratados obtenidos al reutilizar los licores de pre-tratamiento EW.

La cristalinidad de la celulosa es capaz de influir en el comportamiento de la BLC; las áreas de baja cristalinidad (amorfos) tienen una mayor susceptibilidad a hidrolizarse que

las áreas con una cristalinidad más alta. El Índice de cristalinidad (CrI) (Tabla 10) de la PT sin pre-tratar es 67,5 %; este valor se incrementa a 75,9 % después del primer pre-tratamiento (S1) y aumenta gradualmente en las siguientes cocciones al re-utilizar los licores, alcanzando un valor máximo de 80,5 % (S6). Este aumento se debe a la eliminación de hemicelulosas, lignina y de celulosa amorfa (más accesible), causada por el pre-tratamiento con licores progresivamente más agresivos. Y que resulta en un sólido rico en celulosa, con una mayor concentración de celulosa cristalina.

Tabla 10. Índice de cristalinidad de la paja de trigo y los sólidos pre-tratados al reutilizar sucesivamente los licores de pre-tratamiento mediante mezclas de etanol-agua.

Muestra	CrI (%)	Incremento (%)
PT	67,50	-
S1	75,93	12,49
S2	75,84	12,36
S3	76,75	13,71
S4	80,22	18,86
S5	80,04	18,58
S6	80,55	19,34

PT: paja de trigo; **CrI:** Índice de cristalinidad; **S1-S6:** sólidos pre-tratados obtenidos al reutilizar sucesivamente los licores de pre-tratamiento mediante mezclas de etanol-agua (EW).

Finalmente, los cambios morfológicos causados por el pre-tratamiento al reutilizar los licores se observaron mediante SEM (Figura 27). Los resultados mostraron que la PT (sin pre-tratar), tiene zonas con escamas amorfas y otras áreas con una estructura laminar compacta y rígida, relacionada con la baja digestibilidad enzimática. Los sucesivos pre-tratamientos eliminan las hemicelulosas y la lignina, destruyen la estructura y doblan y separan las fibras. Esto provoca un aumento del área activa, facilitando el acceso de las enzimas al sustrato (celulosa). Además se observó, que después de una reutilización

intensiva del licor aparecen partículas esféricas que podrían estar relacionadas con la precipitación de lignina.

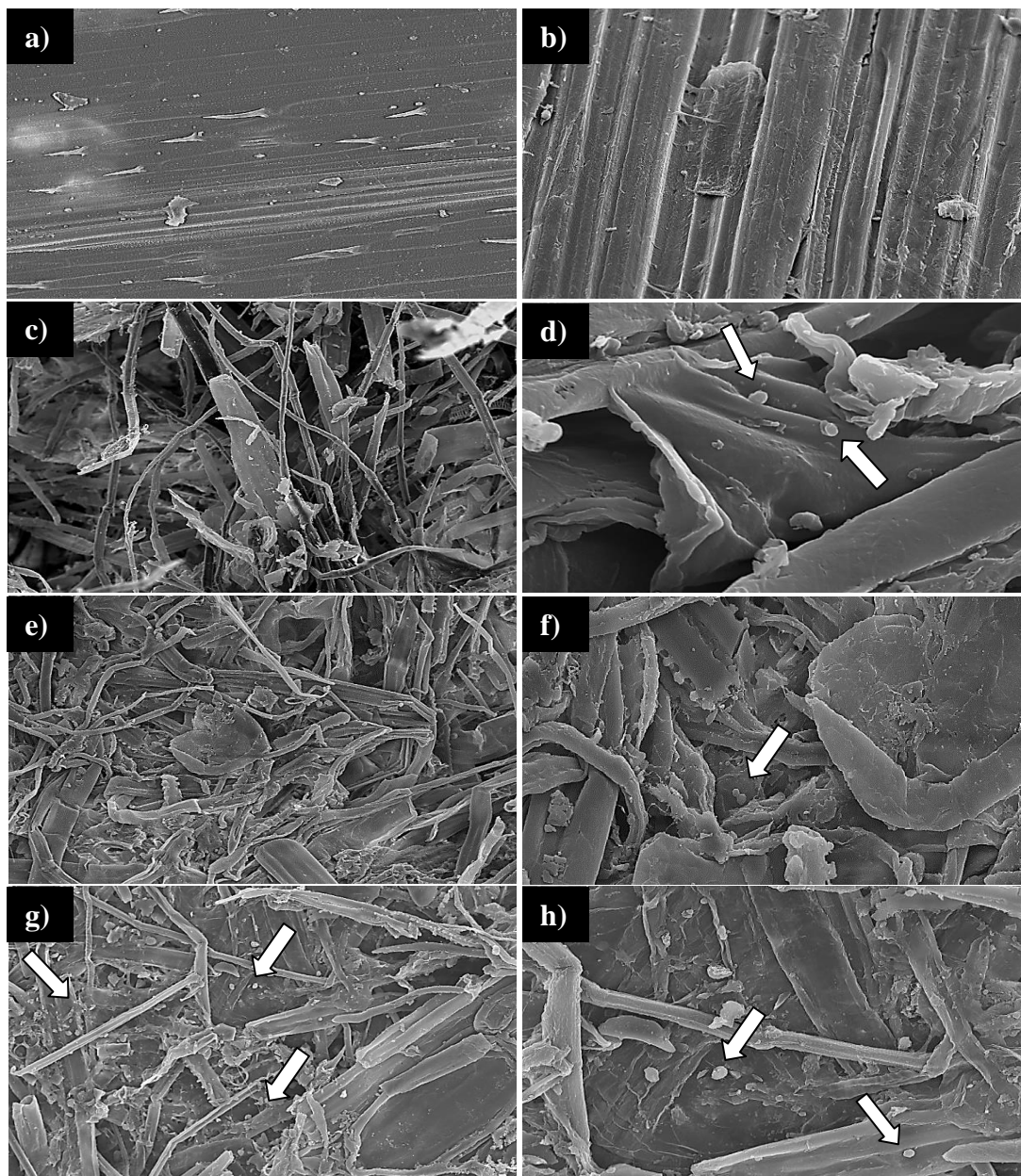


Figura 27. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM, “scanning electron microscopy”). **a)** y **b)** Paja de trigo (PT); **c)** y **d)** S1 (sin reutilización); **e)** y **f)** S3; **g)** y **h)** S6. **Izquierda** (a, c, e): 200X. **Derecha** (b, d, f): 500X. Las flechas señalan las partículas en forma de esfera.

Por otro lado, a partir de la caracterización de los licores (L1 a L6) (Figura 28), se ha observado que, a medida que el licor de pre-tratamiento se reutiliza, se vuelve más concentrado, lo que se evidencia por un aumento constante en la cantidad de todos los compuestos evaluados. El compuesto encontrado en mayor concentración, en todos los licores, fue la xilosa, llegando a alcanzar una concentración de 11,7 g/L en L6 (quinto re- uso del licor) como resultado de la alta solubilización de las hemicelulosas debido al pre- tratamiento.

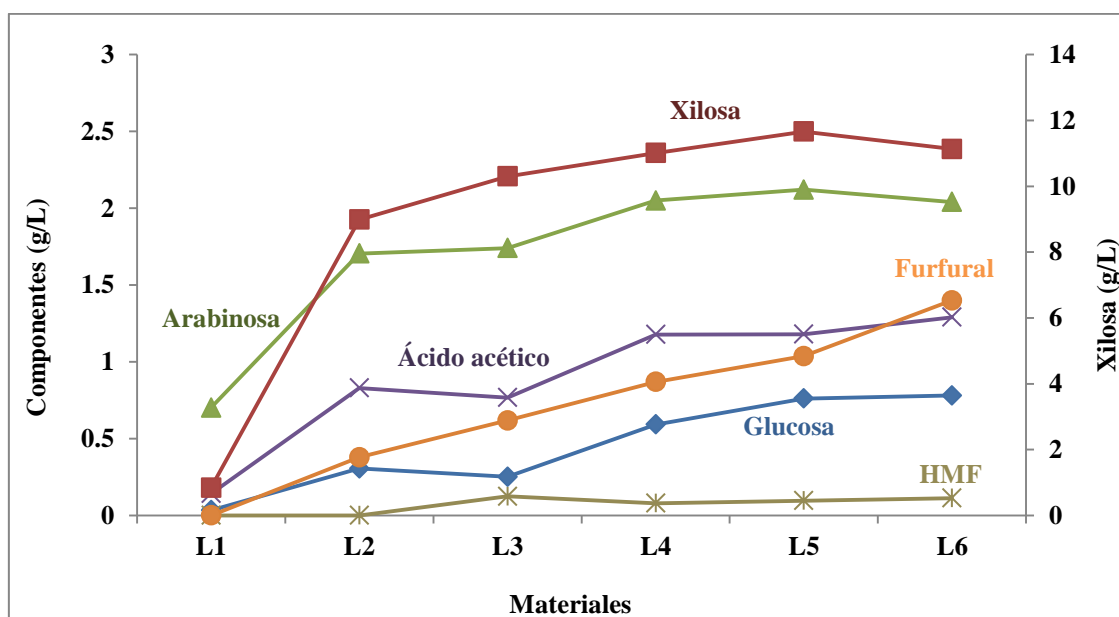


Figura 28. Composición de las fracciones líquidas (L1 a L6) obtenidas al reutilizar el licor de pre-tratamiento, al fraccionar (condiciones optimizadas) la paja de trigo (PT) mediante una mezcla de etanol-agua (EW).

Durante dicho pre-tratamiento, inevitablemente, se produce la degradación de los principales componentes de la BLC, generándose compuestos inhibidores de las etapas siguientes, los que se concentran principalmente en el licor, pero que también son retenidos en la fracción sólida y que son difíciles de eliminar. En este trabajo se midió la producción de HMF, furfural y ácido acético, encontrándose que el furfural (1,4 g/L) se obtuvo en concentraciones más altas que el HMF (0,1 g/L), lo que se relaciona con la naturaleza más lábil de las pentosas. Por otro lado, se observó que la concentración de

ácido acético aumentó constantemente con la reutilización de los licores debido a la desacetilación de las hemicelulosas, alcanzando una concentración de 1,3 g/L en L6.

Se ha considerado la digestibilidad enzimática como el criterio principal para evaluar la efectividad del pre-tratamiento de la PT y la estrategia del re-uso de los licores. Al hidrolizar enzimáticamente el sólido obtenido del primer pre-tratamiento (Figura 29) se obtuvo un rendimiento en glucosa de 76,7 % (a las 72 h) lo que demuestra la eficacia del pre-tratamiento mediante una mezcla EW en las condiciones optimizadas en esta Tesis. Con la reutilización sucesiva del licor de pre-tratamiento (hasta cinco veces) se ha observado una mayor digestibilidad enzimática, lográndose un rendimiento máximo del 95,3 % para S6. Por otro lado, se evaluó la variación en la tasa de conversión de glucosa, observándose un aumento considerable al aplicar el primer pre-tratamiento (8,6 g de glucosa h^{-1} para S1) y que al re-utilizar el licor existe un aumento gradual en la tasa inicial alcanzando un máximo de 14,6 g de glucosa h^{-1} (S6). Sin embargo, después de 24 h, las velocidades de conversión se aproximan.

Como se comentó anteriormente, al reutilizar sucesivamente los licores, se observó una disminución en el contenido de grupos acetilo en la fracción sólida, hecho que ha sido reportado como otro factor que influye en el desempeño de la HE, debido a que provoca el hinchamiento del material, afectando a la interacción entre las enzimas y la celulosa.

Debido a que el ácido acético fue el compuesto de degradación encontrado en mayor concentración en los licores obtenidos, se consideró que su acumulación, podría ser el factor causante de la mayor digestibilidad de los sólidos obtenidos al reutilizar sucesivamente los licores. Además, los sistemas ácido acético-agua han sido bien estudiados y es bien sabido que el ácido acético es eficaz en la deslignificación de la BLC. Por lo tanto, se realizó un experimento control, donde se agregó dicho compuesto al licor fresco, en la misma concentración encontrada en el último experimento de reutilización (L6), y se evaluó la composición química del sólido obtenido, su digestibilidad enzimática, así como la velocidad de la hidrólisis. Los resultados mostraron una mayor RG (96,8 %), una leve mejora en la eliminación de lignina (64,9 %) aunque no ha tenido efecto alguno sobre la HX, lo que sugiere que se ha logrado la capacidad máxima de eliminación de hemicelulosas. Por otro lado, la HE del sólido pre-tratado con

la mezcla de etanol-agua-ácido acético mejoró claramente, con un aumento progresivo del rendimiento de glucosa que supone un 83,4 % después de solo 48 h y un 89,7 % después de 72 h. Esto significa que la presencia de ácido acético en el licor reutilizado podría ser responsable (al menos en parte) de las diferencias encontradas en la tasa de sacarificación de sólidos producidos con licor fresco y con licores reutilizados.

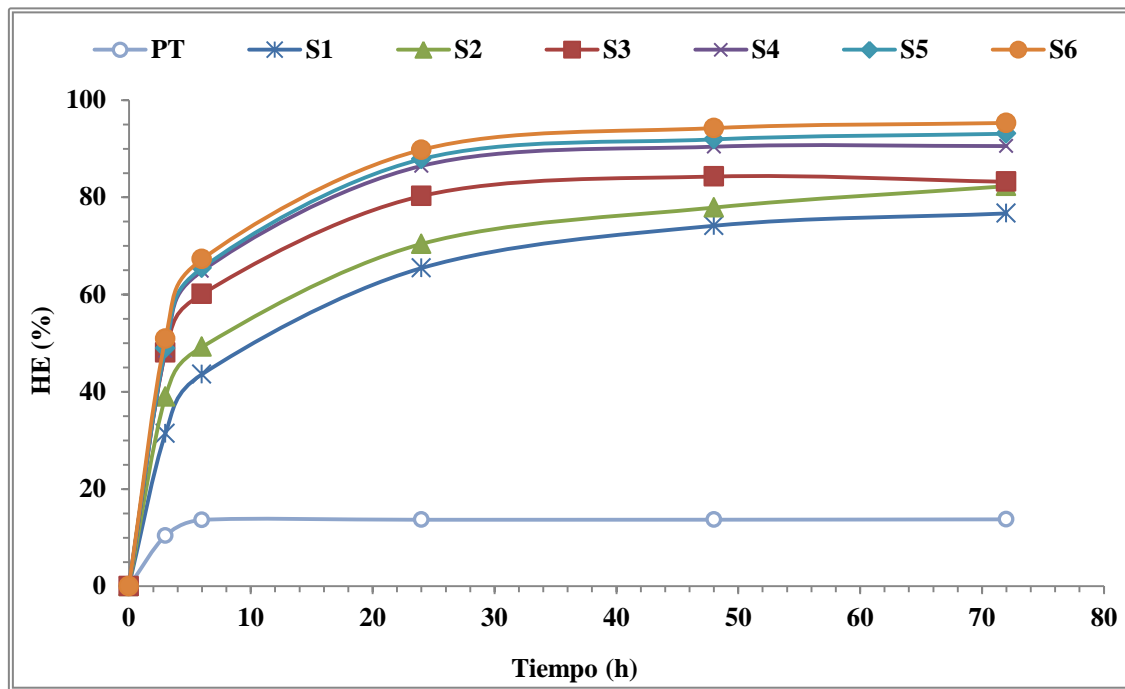


Figura 29. Evolución del rendimiento de la hidrólisis enzimática (HE) de la paja de trigo sin pre-tratar (PT) y de los sólidos obtenidos por fraccionamiento con una mezcla de etanol-agua (EW) (condiciones optimizadas) (S1) y sucesivas reutilizaciones de los licores residuales (S2-S6).

La digestibilidad enzimática se relaciona con la eliminación de lignina y hemicelulosas, tal vez debido al aumento de la superficie y de la porosidad. Las imágenes de SEM indicaron que la estructura de la biomasa estaba deformada y sus fibras expuestas por el pre-tratamiento. Otra explicación para la mejor digestibilidad de los sólidos pre-tratados con los licores reutilizados podría ser el cambio en la cristalinidad de la celulosa. La medida del CrI de los sólidos, puso de manifiesto el aumento con la reutilización del licor, lo que refleja la eliminación de la parte amorfa de la celulosa. Sin embargo, el CrI del sólido obtenido con el tratamiento suplementado con ácido acético, no mostró

diferencias con respecto a S1, pero estaba por debajo del encontrado con la quinta reutilización, por lo que se descarta que el efecto del ácido acético sobre la hidrólisis de la celulosa se deba a un cambio en la cristalinidad. Por otro lado, la adición de ácido acético al licor fresco ha supuesto una pequeña mejora en el grado de deslignificación, lo que puede favorecer parcialmente el acceso de las celulasas a los sólidos y ser este aumento, el responsable de la mejor sacarificación. En resumen, la acumulación de ácido acético en los licores reutilizados parece ser una causa para la mejora en la digestibilidad de los sólidos ricos en celulosa. Sin embargo, los mecanismos de esta mejora en la digestibilidad aún no se comprenden completamente.

Como resumen, la estrategia de reutilización sucesiva (hasta un total de cinco veces) de los licores residuales del pre-tratamiento EW de la PT, es un buen método para ahorrar agua y energía en su fraccionamiento. Permite obtener un sólido que, a pesar de disminuir su contenido de glucanos, muestra una clara mejora en su digestibilidad, tanto en el rendimiento en glucosa como en la velocidad de sacarificación. Paralelamente, los licores residuales se van concentrando en productos como xilosa, ácido acético y furfural, lo que facilitará su extracción de la disolución y rebajará costes.

3.4. Mejora de la digestibilidad enzimática de la paja de trigo

En este apartado se describen los resultados encontrados al determinar el efecto del uso de aditivos en el rendimiento de la digestibilidad enzimática de la PT pre-tratada (EW), con alta y baja severidad, basado en la idea de que la conversión de la celulosa en glucosa mejoraría al aumentar la disponibilidad de enzimas en el medio de reacción.

Publicación V: Utilización de aditivos en la etapa de hidrólisis enzimática

Aumentar el rendimiento de la sacarificación enzimática y rebajar paralelamente los costes de separación del producto es un objetivo difícil de lograr en el fraccionamiento de la BLC. El planteamiento que se hace en esta Tesis Doctoral lleva implícito el poder conseguir un buen método de fraccionamiento de la BLC, pero sin incurrir en un gasto energético excesivo. Por este motivo, la Publicación IV se centró en el ahorro de energía

en lo relacionado con la recuperación del disolvente. En la Publicación V, el enfoque es tratar de solventar los bajos rendimientos en la etapa de HE debido a la acción inhibidora de la lignina. Con este objetivo, se utilizaron surfactantes no iónicos y proteínas, en tres concentraciones diferentes (Tabla 11) para mejorar la producción de glucosa a partir de PT pre-tratada mediante EW, comparando materiales con una alta y baja deslignificación obtenidos en las condiciones indicadas en la Tabla 12.

Tabla 11. Concentración de aditivos (surfactantes y proteínas) empleados.

Aditivos	Concentración		
	Baja	Media	Alta
Surfactantes (no-iónicos)	% sobre base seca		
Polioxietileno ₂₀ sorbitán monooleato: Tween 80 (TW)	1,07	10,7	53,5
Polietilenglicol 6000 (PEG)	1	10	50
Proteínas	% sobre base seca		
Albúmina de suero bovino (BSA)	1	10	50
Caseína (CAS)	1	10	50
Leche desnatada en polvo (SMP)	3	30	150

La conversión de celulosa, medida como la cantidad de glucosa producida, ha sido considerada como criterio para medir la efectividad de los aditivos en la etapa de hidrólisis enzimática. De esta forma, el rendimiento (HE) de las muestras controles (sin aditivos) se determinó en 67,4 % y en 82,5 % (a las 72 h), dependiendo de si el sustrato celulósico tiene una deslignificación baja (T1) o alta (T2), respectivamente (Tabla 13). Esto indica que el pre-tratamiento EW es eficiente para fraccionar y mejorar la digestibilidad enzimática de la BLC, pero necesita de condiciones severas de reacción, que provoquen una deslignificación intensa.

Tabla 12. Condiciones de pre-tratamiento mediante mezclas de etanol-agua.

Experimento	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	L/S (L/kg)	Etanol (v/v)	Factor H
T1	60	190	30	0,50	255
T2	90	150	25	0,50	4590

L/S: relación líquido/sólido (L/Kg).

Tabla 13. Efectos del pre-tratamiento de la paja de trigo mediante mezclas de etanol-agua, en condiciones de baja y alta deslignificación.

Experimento	Factor H	RG (%)	HX (%)	GD (%)	HE (%, 72 h)
PT	-	-	-	-	24,3
T1	255	80,9	59,5	47,7	67,4
T2	4590	89,8	84,6	73,1	82,5

PT: paja de trigo; **RG:** recuperación de glucano; **HX:** hidrólisis de xilanos; **GD:** grado de deslignificación; **HE:** rendimiento de hidrólisis enzimática.

La lignina afecta a la sacarificación al actuar como una barrera física, restringiendo el acceso a las enzimas, además de unirse covalentemente a los aminoácidos hidrófobos expuestos en la superficie de las celulasas obtenidas de *T. reesei*. Por lo que, la deslignificación de los materiales tiene dos efectos principales que contribuyen a obtener un HE superior; el aumento de la accesibilidad de la celulosa y la reducción del contenido de lignina en la superficie de las fibras, lo que disminuye la adsorción no productiva de enzimas en los fragmentos de lignina. Los aditivos utilizados en este estudio pretenden evitar la retención de enzimas en la lignina y mantener celulasas libres capaces de hidrolizar el sustrato celulósico, mediante la adsorción de las moléculas aditivas en los depósitos de lignina, lo que mejoraría el contacto entre las celulasas y la superficie de la celulosa.

Se evaluó la capacidad de los surfactantes no iónicos TW y PEG para aumentar los rendimientos de sacarificación de celulosa. Los resultados muestran (Tabla 14) que para muestras poco deslignificadas (T1) hay una mejora del rendimiento en la producción de glucosa independientemente del tiempo de hidrólisis o del agente tensoactivo empleado. Al agregar TW en T1 se encontró que la mejora depende de la dosis de surfactante, debido a que el rendimiento aumenta a medida que lo hace la concentración de surfactante agregado, mejorándose el HE desde un 67,4 % (sin adición de surfactante) a un 72,6 %, con un rendimiento ligeramente mejor para PEG (74,4 %). T2 (altamente deslignificado) mostró una respuesta diferente a la adición de surfactante, observándose una disminución en el rendimiento de glucosa, que es más pronunciado con una mayor dosis de surfactante. Por lo tanto, parece claro que el efecto de los surfactantes no iónicos en la hidrólisis de celulosa depende de la composición del sustrato, porque el GD juega un papel importante. Una explicación para ese comportamiento es que la BLC pre-tratada con un bajo consumo de energía (factor H) aún conserva una fracción considerable de la lignina original (52,3 %) que podría ser responsable de la adsorción improductiva de las celulasas. En este caso, el surfactante se unirá a la superficie de lignina, dejando más celulasas libres capaces de hidrolizar las cadenas de celulosa. Este mecanismo explicaría el aumento de la hidrólisis de celulosa a medida que aumenta la dosis de surfactante. Por el contrario, la muestra más deslignificada, con solo el 26,9 % de la lignina inicial, muestra el comportamiento opuesto.

Cuando los agentes tensoactivos están en exceso sobre la lignina, la cantidad de aditivo adicional podría interactuar con las enzimas que bloquean su actividad hidrolítica, lo que sería coherente con la disminución en el rendimiento de glucosa causada por el aumento de agente tensoactivo. Por lo tanto, la adición de un surfactante no iónico, TW o PEG, solo es eficaz si la BLC pre-tratada aún retiene una cantidad importante de lignina. Esto apunta, como una posible estrategia, gastar menos energía en la etapa de pre-tratamiento y emplear un surfactante para aumentar la HE.

Como alternativa a los surfactantes no-iónicos, se evaluó la capacidad de tres proteínas (BSA, CAS y SMP), de promover la sacarificación enzimática. Se encontró que BSA tiene un efecto positivo independiente del contenido de lignina de las muestras (T1 y T2). Incluso dosis moderadas de BSA causan mejoras del 8,3 % y 2,9 % para las muestras

poco deslignificadas y muy deslignificadas, respectivamente (ver Tabla 15). Lo que podría explicarse, como en el caso de los surfactantes, por la mayor cantidad de celulasas disponible para reaccionar con el sustrato. Sin embargo, la cantidad de BSA es crítica, la dosis más alta de BSA es tan grande que disminuyó el rendimiento de glucosa en torno al 2,3% para el sustrato poco deslignificado y al 6,2 % para el alto deslignificado (a las 72 h). Es decir, un exceso en la concentración agregada ha demostrado ser perjudicial para la HE de la celulosa. Esto se debe probablemente al hecho de que el exceso de proteína interactúa con las celulasas bloqueando su acción. Este comportamiento es coherente con una interacción de lignina-BSA, lo que explicaría el peor rendimiento de glucosa en sustratos altamente deslignificados por un mayor exceso de BSA que bloquea la acción de la enzima.

Al comparar BSA con CAS, se observó que el rendimiento de glucosa siempre es mayor cuando se agrega BSA en dosis bajas o medias. Sin embargo, a altas dosis de proteínas, la adición de CAS tiene un mejor rendimiento independientemente del contenido de lignina del sustrato de la BLC. Los aumentos máximos suponen un 5,4 % y un 6,0 % más para los sustratos con alto contenido de lignina y bajo contenido de lignina, respectivamente, aunque siempre utilizando la dosis más alta de proteína probada. El costo de CAS es bajo (aproximadamente 5 €/ton) lo que podría justificar su uso.

Otra posibilidad es agregar SMP, un producto de la industria láctea con un precio aún menor que CAS (aproximadamente 2 €/ton). Contiene aproximadamente un tercio de CAS en su composición, por lo que para mantener niveles de CAS similares, las dosis de SMP empleadas fueron tres veces superiores. Sin embargo, los resultados han demostrado que el SMP tiene menos efecto y el rendimiento de la glucosa solo aumenta con la dosis más baja, con mejoras similares obtenidas para sustratos poco deslignificados y altamente deslignificados, 5,6 % y 4,1 %, respectivamente. Las dosis más altas de SMP mostraron una caída progresiva del rendimiento de glucosa, incluso bajo el rendimiento obtenido sin aditivo. Este hecho sugiere que el nivel de caseína no es el único responsable de los cambios en el rendimiento de glucosa, sino también los efectos de otros compuestos presentes en SMP, que podrían afectar las actividades enzimáticas. En resumen, el uso de proteínas para aumentar la eficiencia de las enzimas celulolíticas es más eficiente que la adición de surfactantes no iónicos, alcanzándose rendimientos del 75,5 % (BSA, a las 72

h) para pulpas poco deslignificadas. Además, el rendimiento de glucosa es incluso mejor para sustratos con bajo contenido de lignina, donde el efecto de los surfactantes no iónicos fue negativo, pero donde el rendimiento de glucosa alcanzó un valor de 88,6 % (CAS, a las 72 h).

Tabla 14. Efectos de la adición de surfactantes sobre el rendimiento de glucosa.

Muestra - Surfactante	Dosis (% sobre base seca)	HE (%) a:			
		6 h	24 h	48 h	72 h
PT	0	11,3	20,5	23,9	24,3
T1	0	32,7	52,7	61,1	67,4
T1 - TW	1,0	34,4	54,3	62,4	67,9
	10,7	35,5	56,1	63,9	69,5
	53,5	36,9	57,5	66,0	72,6
T1-PEG	1	33,4	53,6	62,5	67,8
	10	35,4	55,0	63,8	69,2
	50	41,1	60,3	71,2	74,4
T2	0	32,7	57,2	75,3	82,5
T2-TW	1,0	30,6	55,8	74,1	80,7
	10,7	28,1	52,1	70,6	77,6
	53,5	23,5	49,6	68,3	74,5
T2-PEG	1	31,0	54,9	72,4	80,6
	10	30,1	52,5	70,1	77,4
	50	27,5	48,7	65,7	72,4

PT: paja de trigo; **TW:** Tween 80; **PEG:** Polietilenglicol 6000; **HE:** Rendimiento de hidrólisis enzimática.

Finalmente, se determinaron las tasas de conversión de glucosa de la materia prima y de todos los sólidos pre-tratados hidrolizados enzimáticamente. Para los controles (T1 y T2) Se encontró, que como se esperaba, al aumentar la severidad del pre-tratamiento, aumenta la tasa de hidrólisis inicial; sin embargo, a medida que avanza la reacción, la tasa de conversión se aproxima asintóticamente a un valor mínimo.

De todo lo anterior cabe concluir que la estrategia de combinar baja deslignificación en el pre-tratamiento con el empleo de aditivos que eviten la inhibición por la lignina ha mostrado un éxito moderado. Los rendimientos máximos alcanzados (75,7 %) con el sustrato menos deslignificado nunca se aproximaron al rendimiento en glucosa obtenido con el sustrato más deslignificado sin la presencia de aditivos (82,6 %). El contenido en lignina del sustrato ha demostrado ser decisivo en el rendimiento final. La opción más favorable combina alta deslignificación con el empleo de una proteína barata y no utilizada antes para este fin, como es la CAS. Con ella se eleva el rendimiento hasta un 88,6 % de glucosa empleando un 50 % de CAS sobre pasta seca. La explicación a estos resultados está en que los surfactantes y las proteínas bloquean la lignina del sustrato y dejan libres en el medio a las celulasas (que no se retienen en la lignina). El exceso de los aditivos tiene también un efecto perjudicial y reduce la producción de glucosa en las pastas más deslignificadas.

Tabla 15. Efectos de la adición de proteínas sobre el rendimiento de glucosa.

Muestra- Proteína	Dosis (% en base seca)	HE (%) a:			
		6 h	24 h	48 h	72 h
PT	0	11,3	20,5	23,9	24,3
T1	0	32,7	52,7	61,1	67,4
	1	35,3	54,6	64,4	71,4
T1 – BSA	10	36,7	58,8	67,9	75,7
	50	23,9	47,6	56,4	63,2
	1	35,7	54,2	61,9	67,4
T1 – CAS	10	36,7	56,9	64,3	68,9
	50	39,1	59,0	67,2	72,8
	3	36,4	57,1	66,1	73,0
T1 – SPM	30	26,6	46,6	56,3	61,7
	150	22,9	36,1	47,8	52,6
T2	0	32,7	57,2	75,3	82,5
	1	37,5	63,6	79,6	84,5
T2 – BSA	10	38,3	64,2	80,3	85,4
	50	24,4	50,8	68,5	76,3
	1	33,7	57,8	76,0	82,5
T2 – CAS	10	34,5	59,0	77,4	84,4
	50	38,9	63,3	82,5	88,6
	3	37,8	61,7	80,5	86,6
T2 – SPM	30	27,3	53,4	72,4	80,8
	150	18,2	34,2	48,6	53,9

PT: paja de trigo; **BSA:** albúmina de suero bovino; **CAS:** caseína; **SMP:** Leche desnatada en polvo; **HE:** rendimiento de hidrólisis enzimática.

- CONCLUSIONES -

En el siguiente apartado, se describen las principales conclusiones derivadas del trabajo realizado en esta Tesis Doctoral. Las conclusiones se describen de acuerdo a una ordenación marcada por los cinco artículos publicados o en proceso de publicación en que se ha plasmado el trabajo y que se incluyen en el Anexo del presente documento.

1. Sobre el estudio del proceso de pre-tratamiento de la biomasa lignocelulosa con mezclas etanol-agua

El estudio de las variables del pre-tratamiento con mezclas de etanol-agua (EW) de la paja de trigo (PT), utilizando un diseño experimental de Taguchi (L_9), muestra que:

- De las variables estudiadas, solo la temperatura tiene un efecto significativo en los resultados obtenidos.
- Las condiciones óptimas de operación en el pre-tratamiento son las siguientes:
Tiempo: 60 min; **Temperatura:** 190 °C; **Relación líquido/sólido (L/S):** 20 L/kg;
Concentración de etanol: 25 % (v/v).

2. Sobre el fraccionamiento de *Cynara Cardunculus L.* (una planta adaptada a suelos con baja fertilidad)

Las condiciones de operación del pre-tratamiento EW de tallos de *Cynara Cardunculus L.* (cardo) con mezclas han sido optimizadas mediante la aplicación de un diseño experimental de experimentos Taguchi (L_9). Los resultados muestran que:

- La única variable que ha mostrado una influencia estadísticamente significativa en dicho pre-tratamiento es la temperatura de operación.
- Las condiciones óptimas de operación para maximizar la producción de glucosa a partir del pre-tratamiento del cardo, seguida de hidrólisis enzimática (HE) son:
Tiempo: 60 min.; **Temperatura:** 190 °C; **Relación L/S:** 20 L/kg; **Concentración de etanol:** 25 % de etanol (v/v).

- El pre-tratamiento EW puede tener un rendimiento del 80 % de glucosa con un consumo de energía bajo a moderado y es eficiente para la valorización del cardo.

3. Sobre la comparación del pre-tratamiento con mezclas de etanol-agua con el pre-tratamiento con ácido sulfúrico diluido

El desarrollo de biorrefinerías integradas, con diversas materias primas buscando diferentes productos, de forma que aumente la capacidad de producción, precisa garantizar que todas las materias primas son procesables. Por ello, se ha comparado la respuesta de tres materias primas a los pre-tratamientos EW y DSA (ácido sulfúrico diluido).

Para las diversas materias primas estudiadas; PT, tallos de cardo y rastrojo de maíz (RM), se puede concluir que:

- El proceso EW es más eficiente que el DSA a bajos consumos de energía para generar un sólido pre-tratado rico en celulosa, fácilmente hidrolizable a glucosa.
- El pre-tratamiento EW provoca una intensa deslignificación del material, responsable de los mayores rendimientos de glucosa.

4. Mejora de la sostenibilidad ambiental del proceso

El pre-tratamiento EW es efectivo para fraccionar la biomasa lignocelulósica (BLC), aunque la recuperación del disolvente consume una elevada cantidad de energía. Por ello, se ha estudiado la reutilización del licor de pre-tratamiento, lo que supone una alternativa para reducir los costes de operación. Tras la reutilización sucesiva del disolvente (hasta cinco veces), los licores residuales han mostrado los siguientes resultados:

- La reutilización del licor de pre-tratamiento modifica ligeramente la composición química de los sólidos pre-tratados, provocando una pérdida moderada de celulosa a medida que aumenta el número de reutilizaciones.

- El efecto más destacado de la reutilización es el aumento de la digestibilidad del sólido desde un 80 % hasta cerca de un 95 %.
- La velocidad de hidrólisis de celulosa a glucosa aumenta al reutilizar los licores, debido, en parte, a la acumulación de ácido acético (1,3 g/L en la quinta reutilización) en el licor residual.
- No se encontraron diferencias significativas en la eliminación de las hemicelulosas (xilanos) y en la deslignificación a medida que aumenta el número de reutilizaciones.

5. Mejora de la digestibilidad enzimática de la paja de trigo mediante aditivos en el pre-tratamiento con mezclas de etanol-agua

El contenido de lignina de un sustrato lignocelulósico es decisivo para alcanzar un alto rendimiento de glucosa mediante sacarificación enzimática. Una posibilidad para no utilizar una cantidad alta de energía en el pre-tratamiento de la BLC es la estrategia de combinar un pre-tratamiento de baja deslignificación con el uso de aditivos para evitar la inhibición de la lignina y elevar el rendimiento en glucosa. Diversos aditivos, como los surfactantes no-iónicos (ya contrastados) y proteínas de bajo precio, fueron probados a distintas concentraciones. Los resultados de la HE de los dos sustratos (PT pre-tratada mediante EW con alta y con baja deslignificación) han mostrado que:

- El rendimiento máximo de glucosa del sustrato con baja deslignificación tratado con los aditivos (75,7 %) nunca ha alcanzado el resultado obtenido con una deslignificación más intensa (82,6 %).
- La opción más favorable combina una alta deslignificación con el uso de una proteína barata y no probada, la caseína (CAS), debido a que el rendimiento de glucosa aumenta en un 6 % (hasta un 88,6 %) empleando las mejores condiciones (50 % de CAS sobre materia seca).

- Un mecanismo que involucre el bloqueo de la lignina por surfactantes o proteínas explicaría por qué los sustratos con alto contenido de lignina son, en proporción, los más beneficiados por el empleo de aditivos.
- Sin embargo, el exceso de concentración de los aditivos tiene un efecto perjudicial en la producción de glucosa, lo que se ha asociado a una posible interacción del exceso de aditivo con las enzimas que catalizan la hidrólisis.

- CONCLUSIONS -

In the following section, the main conclusions derived from the work carried out in this Doctoral Thesis are described. The conclusions are described according to an order marked by the five articles published or in the process of publication in which the work has been included; the papers are included in the Annex to this document.

1. On the study of the pre-treatment process of lignocellulose biomass with ethanol-water mixtures

The study of the variables of pre-treatment with mixtures of ethanol-water (EW) of wheat straw (WS), using an experimental Taguchi design (L_9), shows that:

- Of the variables studied, only the temperature has a significant effect on the results.
- The optimal operating conditions for the pre-treatment are the following:
Time: 60 min; **Temperature:** 190 °C; **Liquid/solid (L/S) ratio:** 20 L/kg; **Ethanol concentration:** 25 % (v/v).

2. On the fractionation of *Cynara Cardunculus L.* (a plant adapted to soils with low fertility)

The conditions of operation of the pre-treatment of *Cynara Cardunculus L.* (cardoon) with EW mixtures have been optimized by applying an experimental design of Taguchi experiments (L_9). The results show that:

- The only variable that has shown a statistically significant influence on said pre-treatment is the operating temperature.
- The optimal operating conditions to maximize the production of glucose from the pre-treatment of the cardoon, followed by enzymatic hydrolysis (EH) are:
Time: 60 min; **Temperature:** 190 °C; **L/S ratio:** 20 L/kg; **Ethanol concentration:** 25 % (v/v).

- The EW pre-treatment, under the best conditions, has an 80 % glucose yield with a low or moderate energy consumption and is efficient for the valorization of the cardoon.

3. On the comparison of the pre-treatment with mixtures of ethanol-water and diluted sulfuric acid

The development of integrated biorefineries, with different raw materials looking for different products, in order to increase production capacity, needs to guarantee that all raw materials are process able. Therefore, the responses of three raw materials have been compared to the EW and DSA (diluted sulfuric acid) pre-treatments. For the various raw materials studied: WS, stems of cardoon and corn stubble (CS), it can be concluded that:

- The EW process is more efficient than the DSA at low energy consumption to generate a pre-treated solid rich in cellulose, easily hydrolysable to glucose.
- The EW pre-treatment causes intense delignification of the material, responsible for the highest glucose yields.

4. Improvement of the environmental sustainability of the process

The EW pre-treatment is effective to fractionate the lignocellulosic biomass (LCB), although the recovery of the solvent consumes a high amount of energy. Therefore, the reuse of the pre-treatment liquor has been studied, which is an alternative to reduce operating costs. After the successive reuse of the solvent (up to five times), residual liquors have shown the following results:

- The reuse of the pre-treatment liquor slightly modifies the chemical composition of the pre-treated solids, causing a moderate loss of cellulose as the number of reuses increases.

- The most outstanding effect of the reuse is the increase in the digestibility of the solid from 80 % to close to 95 %.
- The rate of hydrolysis of cellulose to glucose increases when reusing liquors, due, in part, to the accumulation of acetic acid (1.3 g/L in the fifth reuse) in the residual liquor.
- No significant differences were found in the elimination of hemicelluloses (xylans) and delignification as the number of reuses increases.

5. Improvement of the enzymatic digestibility of wheat straw with additives in the pre-treatment EW

The lignin content of a lignocellulosic substrate is decisive for achieving a high glucose yield by enzymatic saccharification. One possibility in order to reduce the energy consumed in the pre-treatment of LCB is the strategy of combining a low-level delignification pre-treatment with the use of additives to avoid inhibition of lignin and increase glucose yield. Various additives, such as non-ionic surfactants (already contrasted) and low-priced proteins were tested at different concentrations. The results of the EH of the two substrates (WS pretreated by EW with high and low delignification) have shown that:

- The maximum glucose yield of the substrate with low delignification treated with the additives (75.7 %) has never reached the result obtained with a more intense delignification (82.6 %).
- The most favorable option combines a high delignification with the use of a cheap and unproven protein, casein (CAS), because the glucose yield increases by 6 % (up to 88.6 %) using the best conditions (50 % CAS on dry matter).

- A mechanism that involves the blocking of lignin by surfactants or proteins would explain why substrates with a high lignin content are, in proportion, the most benefited by the use of additives.
- However, the excessive concentration of the additives has a detrimental effect on the production of glucose, which has been associated with a possible interaction of excess additive with the enzymes that catalyze the hydrolysis.

- ANEXO (Publicaciones) -

Autores: Priscilla Vergara, Mateusz Wojtusik, Esteban Revilla, Miguel Ladero, Félix García-Ochoa, Juan C. Villar.

Título: Wheat straw fractionation by ethanol-water mixture: Optimization of operating conditions and comparison with diluted sulfuric acid pre-treatment.

Revista: Bioresource Technology. 256 (2018) 178-186.

Índice de impacto: 6.669

Categoría: Ingeniería agrícola, biotecnología y microbiología aplicada, combustibles y energía.

Sub-categoría: Biomasa & Utilización de material prima. Conversión enzimática/tratamiento de celulosa/lignocelulosa.

Resumen: El fraccionamiento de la biomasa lignocelulósica (BLC) mediante mezclas de etanol-agua (EW) promueve la eliminación de la fracción de hemicelulosas, lo que ayuda a la deslignificación del material, gracias a la ruptura de los enlaces lignina-carbono, favoreciendo de esta forma, la producción de celulosa, azúcares y lignina dentro de un esquema de biorrefinería. El objetivo de este estudio fue optimizar el fraccionamiento EW de la paja de trigo (PT) utilizando la metodología experimental Taguchi (L_9). Los factores evaluados fueron: tiempo, temperatura, relación líquido/sólido (L/S) y contenido de etanol en el licor. Donde, para cada factor, se probaron tres niveles para de esta forma minimizar la relación Señal/Ruido (mayor-mejor). Posteriormente, los pre-tratamientos de hidrólisis con ácido sulfúrico diluido (DSA) y EW fueron comparados en términos de consumo de energía y la capacidad del residuo sólido celulósico de hidrolizarse enzimáticamente (HE) a glucosa.

La PT fue pre-tratada bajo varias condiciones. El reactor se cargó con 100 g de PT (base seca) y la mezcla EW suplementado con 1,0 % p/p de H_2SO_4 (sobre sólido seco) como catalizador, o alternativamente, con una solución acuosa H_2SO_4 al 1,0 % (p/p) (sobre sólido seco). Los materiales pre-tratados obtenidos fueron filtrados al vacío para obtener fracciones líquidas y sólidas, las que se lavaron con abundante agua, se homogenizaron,

se pesaron y se hidrolizaron enzimáticamente con una mezcla de celulasas comerciales (Celluclast 1.5 L y Novozyme 188). El rendimiento de la HE se evaluó, tomando muestras a distintos tiempos de reacción y midiendo la producción de glucosa mediante HPLC.

Bajo las condiciones evaluadas en este estudio, se determinó que la temperatura es la única variable del pre-tratamiento EW con un efecto significativo en la calidad de los sólidos obtenidos. Además, el pre-tratamiento EW de la PT es más eficaz que DSA, debido a su mayor capacidad de deslignificación, permitiendo obtener un alto rendimiento de producción de glucosa (80 %) por hidrólisis enzimática, con una entrada de energía moderada (160 ° C; 45 min), mientras que DSA, necesita una entrada de energía más alta para producir un rendimiento similar.

Enlace: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852418301597>
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.1377>



Wheat straw fractionation by ethanol-water mixture: Optimization of operating conditions and comparison with diluted sulfuric acid pre-treatment

Priscilla Vergara^a, Mateusz Wojtusik^b, Esteban Revilla^a, Miguel Ladero^b, Felix Garcia-Ochoa^b, Juan C. Villar^{a,*}

^a Laboratory of Cellulose and Paper, INIA, Forest Research Center, Ctra. de La Coruña km 7.5, 28040 Madrid, Spain

^b Chemical Engineering Department, Faculty of Chemistry, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Wheat straw
Ethanol-water fractionation
Acid hydrolysis
Biorefinery

ABSTRACT

The fractionation of wheat straw by ethanol-water (EW) pre-treatment was studied regarding its main operating conditions: time, temperature, L/S ratio and ethanol percentage were optimized by using an orthogonal experimental design (Taguchi). Afterwards, diluted sulfuric acid (DSA) hydrolysis and EW treatments have been compared in terms of energy consumption and yield of a cellulosic solid residue able to be enzymatically hydrolyzed to glucose. Experimental results show that temperature is the only variable of EW with a significant effect on the quality of the pretreated solids. EW pre-treatment of wheat straw is more effective than DSA hydrolysis due to its higher capacity of delignification. Moreover, a high glucose yield (80%) can be obtained by enzymatic hydrolysis of a solid pretreated with a moderate energy input EW (160 °C, 45 min) while wheat straw needs of a higher energy input during DSA to produce a similar yield of glucose after saccharification.

1. Introduction

Valorization of agroforestry residues into chemicals and fuels is one alternative to the fossil raw materials and an opportunity to add value to the agricultural and forestry sectors. Cellulose is the most abundant and valuable component of lignocellulosic biomass but its transformation into glucose by cellulolytic enzymes is inhibited by the hemicelluloses-lignin matrix, which surrounds the cellulose micro-fibrils, and by the crystalline regions of cellulose. Both structures are effective barriers against the fungal and bacterial cellulose enzymes and prevent decay of wood and other plant tissues. Therefore, a pre-treatment is necessary to make the cellulose accessible to the hydrolytic enzymes that transform it into glucose, further fermented to biofuels. Diluted acid hydrolysis, hot water extraction and steam explosion are the usual pre-treatments (Perez-Cantu et al., 2013). These methods hydrolyze and remove most of the hemicelluloses, which are converted into sugars and furfural. Lignin is only partially removed, while most of the cellulose remains in the solid phase, although with a reduction in the crystallinity and molecular weight (Parawira and Tekere, 2011; Perez-Cantu et al., 2013; Ravindran and Jaiswal, 2016). However, the economic viability of the global process forces to recover and valorize lignin and hemicelluloses (García et al., 2011). The Organosolv process has been used

to produce pulps as an alternative to the predominant Kraft pulping method. Good quality cellulose pulps were obtained with high yield and purity, while the water-solvent liquor removed lignin and hemicelluloses. Additionally, the lignin can be precipitated from the pulping liquor by removing the solvent. In this way, a solid phase mainly composed by lignin and the aqueous solution of hemicelluloses can be valorized independently (Bozell et al., 2014).

Two organosolv processes have been implemented at pilot or industrial scales: ASAM (a pulping method with alkali-sulfite-anthraquinone-methanol) and ALCELL (ethanol-water delignification). None of these methods have had success in replacing the Kraft process (Young, 1994). Nevertheless, a solvent treatment can be interesting when the cellulose fiber length and strength are not the objectives. Solvents must be water-soluble and many organic substances have been explored including acids, peracids, ethers, ketones, alcohols and phenols. Methanol and ethanol have been frequently proposed because of their availability, low cost and low boiling temperature (Zhao et al., 2009). Ethanol is sometimes preferred due to its lower toxicity and the possibility of being produced in an integrated biorefinery. The treatment temperature depends on the solvent, raw material and delignification degree; it usually exceeds 160 °C (typical for Kraft process) for a time in the range of 30–90 min. Lignin removal occurs through its

* Corresponding author.

E-mail address: villar@inia.es (J.C. Villar).

depolymerization. This is a process that is enhanced by a liquid media with more affinity by the lignin. This circumstance has been expressed by means of the Hildebrand solubility parameter (δ), predicting that a solute will be solubilized in a solvent when the δ values of both are similar (Hildebrand and Scott, 1950; Quesada-Medina et al., 2010). However, the validity of this theory does not include solvents with high polarity, as it is the case of ethanol-water (EW) and methanol-water mixtures. Lignin solubility has a δ value near 14 ($\text{cal}^{1/2}/\text{cm}^{-3/2}$), that is only a reference, because lignin fragments with different molecular weight and functional groups show significant differences in their δ solubility parameter values while ethanol and water have values of 12.08 and 22.41 ($\text{cal}^{1/2}/\text{cm}^{-3/2}$), respectively. Consequently, the lignin removal is not homogeneous and, for a given composition of the liquor, different types of lignin are removed depending of the molecular weight and substituents (Ni and Hu, 1995; Sameni et al., 2017).

Solvent delignification is also promoted by the simultaneous removal of hemicelluloses, what accelerates the liberation of lignin due to the rupture of the lignin-carbohydrate bonds. Lignocellulose has a significant percentage of acetyl groups bound to hemicelluloses, these are easily liberated under mild conditions forming acetic acid that acts as a catalyst and favors hemicellulose hydrolysis (Zhao et al., 2009). Additional acids, usually sulfuric or hydrochloric, are added to promote the hydrolysis although other catalysts (alkali and salts) have been used (Hergert and Pye, 1992). Economic sustainability of the EW pre-treatment forces the recovery of solvent and the valorization of lignin and hemicelluloses. The dissolution of hemicelluloses during the EW fractionation liberates xylose and its oligomers. Xylan hydrolysis occurs together with the reaction of ethanol and xylose, which produces ethyl-xylosides (other pentoses and hexoses form ethyl-derivatives). It has been demonstrated that the amount of ethyl-xylosides depends on the severity of the pre-treatment and it has been suggested that fractionation of sugarcane straw could produce 1.4% of the initial ethanol (Sharazi and van Heiningen, 2017). This fact is an obstacle for the recovery of the solvent and the xylose.

Acid hydrolysis in aqueous media has been frequently used to make the cellulose more accessible but not as a fractionation procedure because it maintains most of the lignin with the cellulosic residual fraction. It is a simple, economic, well-studied method (Mood et al., 2013; Singh et al., 2015) to obtain cellulose to be enzymatically converted into sugars. Under the hydrolysis conditions, lignin is partially dissolved in the acid media, although a fraction of this lignin precipitates after cooling; this phenomenon difficult further action of the hydrolytic enzymes, so it is a source of problems in the global process. The use of strong acid catalysts, as sulfuric acid, reduces the insoluble lignin and simplifies downstream processing (Gütsch et al., 2012). Acid hydrolysis is usually employed for hardwoods and herbaceous plants, although it is not so efficient for softwoods because it produces inhibitors (that affects the enzymatic saccharification and, even more, the subsequent fermentation stage) such as furfural, acetic or formic acids (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000). The residue with condensed lignin also acts as inhibitor of the action of cellulases, increasing the cost of the saccharification (Wojtusik et al., 2017). In fact, Lai and coworkers indicated that lignin modified by a solvent treatment stage does not retain cellulases (Lai et al., 2014), which contributes to the economy of the process. All these facts suggest that a water-solvent liquor could be an effective method to fractionate lignocellulose, being more efficient than others (acid hydrolysis, steam explosion, etc.) to avoid cellulose enzymes inhibition.

In resume, the conversion of lignocellulose to sugars and lignin needs a pre-treatment to make the polysaccharides accessible to the enzymatic saccharification. Diluted sulfuric acid (DSA) hydrolysis is one of the most common methods to pretreat lignocellulose, although it has disadvantages as the formation of inhibitors, the presence of insoluble lignin and the inefficient treatment of softwoods. EW fractionation could be an alternative because it is more selective to separate cellulose, hemicelluloses and lignin, although the energy involved in

the fractionation and the formation of xylosides (able to affect alcohol and sugar recovery) could be a restriction. However, to the best of our knowledge, there are neither works directly comparing EW and DSA pre-treatments, nor exhaustive information to estimate the minimum energy input necessary to obtain a high glucose yield after the enzymatic saccharification of the cellulose.

The aim of this work is to study the fractionation of a lignocellulosic material (wheat straw) by EW liquor (EW treatment), optimizing the operating conditions and comparing the results with those obtained by the DSA treatment. Comparison between both treatments will be made in terms of energy consumption and the production of a cellulosic solid residue susceptible to enzymatic hydrolysis.

2. Materials and methods

2.1. Raw material

The raw material used was wheat straw from the region of Castilla-La Mancha, Spain. The straw was homogenized and air-dried until constant moisture (7.0% w/w) and then stored in polyethylene bags at 23 °C until use. The chemical properties of the material were analyzed (Section 2.4).

2.2. Pre-treatment device and procedure

Wheat straw was pretreated under several conditions. The pre-treatments were carried out in a 6 L tank reactor provided with liquor recirculation, temperature control and sampling. The reactor was loaded with 100 g of wheat straw (dry basis) and the solvent at a liquid/solid ratio (L/S) of 20 L/kg. The fractionation was performed with an EW mixture with 33.3% (v/v) of ethanol (28.8% w/w) or alternatively, with a 1% (w/w) sulfuric acid (H_2SO_4) solution (DSA pre-treatment). For EW fractionation, the effect of adding a 1% (w/w) of H_2SO_4 (relative to dry straw) was also tested.

The pretreated material obtained was vacuum filtered and the solid fraction was washing with 4 L of water. Then, the pre-treatment material was homogenized for 5 min in a laboratory disintegrator, and finally, the solid residue was weighted to determine the solid recovery (SR) (pulp yield).

The pretreated solid was analyzed and chemically characterized as indicated in Section 2.4. The severity of the process was calculated using the H-factor parameter, given by Eq. (1), which considers the treatment temperature (T in K) and time (t in hours) in a way usually employed in the paper industry to measure the energy uptake (Vroom, 1957).

$$H = \int_0^t e^{\left(43.2 - \frac{16115}{T}\right)} dt \quad (1)$$

The effect of the pre-treatment of the raw material was measured in terms of recovery of glucans (RG, %), hydrolysis of xylans (XH, %), degree of delignification (DD, %) and enzymatic hydrolysis (EH, %) or digestibility of material of the cellulose fraction to glucose. However, before comparing both pre-treatments, some parameters of EW delignification must be fixed to make the comparison only in terms of temperature and time (both influencing the energy consumption).

2.3. Taguchi experimental design

This experimental design has been used to study the effect of four operating conditions (factors). It is an orthogonal factorial and fractionated design method able to reduce the number of experiments needed (Kumar et al., 2015). The effect of the factors is determined by computing the signal-to-noise ratio (S/N) of the experimental data for each factor, giving the best performance in the test variables (Bose et al., 2013). In this work, the S/N ratio for *larger-the-better* is considered, and it was calculated (for each run) according to:

Table 1Assignment of the factors and levels by using the L₉ design matrix.

Run	Factor A: Time (min)	Factor B: Temperature (°C)	Factor C: L/S ratio (L/kg)	Factor D: Ethanol (v/v)
T1	60	150	20	0.25
T2	60	170	25	0.33
T3	60	190	30	0.50
T4	90	150	25	0.50
T5	90	170	30	0.25
T6	90	190	20	0.33
T7	120	150	30	0.33
T8	120	170	20	0.50
T9	120	190	25	0.25

Ethanol volumetric percentages correspond with mass percentages of 21.3%, 28.8% and 44.8%.

$$S/N = -10 \log_{10} \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{Y_i^2} \quad (2)$$

where Y_i is signal and n is number of repetitions of each run. The larger S/N ratio value for a factor means a higher influence on the response evaluated (Roy, 1990; Ross, 1996).

In the present study, four factors were considered: time (min), temperature (°C), L/S ratio (L/kg) and ethanol (% v/v). Each of these factors was varied at three different levels; Taguchi design indicates nine experimental runs using the L₉ orthogonal array, as shown in Table 1. The responses considered in order to measure the quality of the pretreated raw material were the following: GR, XH, DD and EH.

The factors or variables having a significant effect have been determined by statistical analysis of variance (ANOVA) and probability (p -value, less than 0.1). From the sum of squares data contribution of each factor (CF) was computed using the following equation:

$$CF(\%) = \frac{SS_f}{SS_T} \cdot 100 \quad (3)$$

where SS_f is the sum of squares of the factor and SS_T is the total sum of squares of all factors.

The model was finally validated by the confirmation runs conducted under operating conditions at optimum and close values of the operating conditions.

2.4. Analytical methods

2.4.1. Solids recovery (SR)

The SR was determined gravimetrically after oven drying until constant weight, according to the following equation:

$$SR(\%) = \left(\frac{W_p}{W_o} \cdot 100 \right) \quad (4)$$

where W_p is the dry weight of pretreated wheat straw and W_o is the dry weight of the original wheat straw employed for pre-treatment.

2.4.2. Chemical composition of raw and Pre-treatment biomass

The concentrations of the main compounds involved in the process (carbohydrates, lignin, acetic acid, ash and extractives) were determined in accordance with the procedures formulated by the National Renewable Energy Laboratory (NREL, Golden, CO) Analytical Methods for Biomass (Sluiter et al., 2006; Sluiter et al., 2008).

The concentration of glucose, xylose and acid insoluble lignin (AIL) were used for calculating glucan, xylan and lignin contents in the pretreated materials; further used to calculate the GR, XH and DD, using the following equations:

$$GR(\%) = \left(\frac{W_{Gp}}{W_{Go}} \cdot 100 \right) \quad (5)$$

$$XH(\%) = \left(1 - \frac{W_{Xp}}{W_{Xo}} \right) \times 100 \quad (6)$$

$$DD(\%) = \left(1 - \frac{W_{Lp}}{W_{Lo}} \right) \times 100 \quad (7)$$

Where W_{Gp} , W_{Xp} , and W_{Lp} are the glucan, xylan and lignin weight in the pretreated wheat straw (dry basis) and W_{Go} , W_{Xo} , and W_{Lo} are their values in the original wheat straw.

Compositions of the liquid fractions obtained during the pre-treatment were also determined according to the following protocol: An aliquot (1 mL) was filtered through a 0.45 mm membrane and used for High Performance Liquid Chromatography (HPLC) determination of mono-saccharides, acetic acid, furfural and hydroxyl-methyl-furfural (HMF). These analyses were carried out in an Agilent Technology 1260 equipment employing a column Aminex HPX-87H, at a temperature of 50 °C, using an aqueous mobile phase containing 5 mmol/L of H₂SO₄ at a flow rate of 0.6 mL/min and using a Refractive Index Detector (RID).

2.4.3. Enzymatic hydrolysis test (EH)

Non-pretreated and pretreated wheat straw was enzymatically hydrolyzed to evaluate cellulose digestibility. EH was performed in 100 mL Erlenmeyer flasks, using 0.05 M citrate buffer (pH 4.8) at 50 °C in orbital shaker at 150 rpm for 72 h, with substrate concentration of 10 g (dry basis)/mL.

Cellulase (Celluclast 1.5 L) from *Trichoderma reesei* ATCC26924 supplemented with cellobiose (Novozyme 188) (both purchased from Sigma-Aldrich Co., Ltd, USA) was employed as enzymatic hydrolysis cocktail. The labeled activities of cellulase and cellobiase were 70 FPU/g and 1274 IU/g, respectively. Cellulase and cellobiase were loaded as 20 FPU/g and 40 IU/g, respectively. All runs of hydrolysis were performed by triplicate.

An aliquot of 1 mL hydrolysate was periodically sampled during the enzymatic hydrolysis and centrifuged at 1.3·10⁵ rpm (18928 g), for 5 min to separate the hydrolysate from the solid residues. The supernatant obtained was filtered through 0.45 μm filter and the liquid analyzed using HPLC to determine the concentration of sugars present in the sample. HPLC conditions were the same used for the analysis of liquid phases after the pre-treatments (described above).

The concentration of glucose was used for calculating the enzymatic hydrolysis yield (EH) according to the Eq. (8) (Rocha et al., 2013).

$$EH = \left(\frac{m_g \cdot f_h}{m_o \cdot y_i} \right) \cdot 100 \quad (8)$$

Where m_g is the glucose mass in the hydrolysate (g); f_h is the conversion factor from glucose to cellulose (taking into account water addition upon hydrolysis for cellulose $f_h = 0.9$); m_o is the initial dry mass of wheat straw (g); y_i is the fraction of cellulose in the wheat straw (0.328 g/g in this case).

3. Results and discussion

3.1. Chemical characterization of raw material

The lignocellulosic material selected for this study was wheat straw and its chemical characterization in the weight percent of the dry matter is presented in Table 2. Carbohydrates account for 65.1% of the dry weight. Cellulose content (represented by glucan content – Gln) was 32.8% and the hemicellulose fraction (represented by xylan content – Xyl) comprises 26.3% of raw material, and small amounts of arabinan (Ara) and acetyl groups (AG) were found. Like other commercially important agro-crops, wheat straw has less lignin (acid-insoluble lignin: AIL and acid soluble lignin: ASL) but more extractives (Ext), as compared with wood species (Atchison, 1993) indicating the greater degree of accessibility and, therefore, the reactivity of the carbohydrate complex to chemical processing. The high ash content (4.1%) is consistent

Table 2

Chemical characterization of wheat straw and the solid fraction obtained after EW pre-treatment (% dry weight basis).

Run	SR (%)	Gln (%)	Xln (%)	Ara (%)	AG (%)	AIL (%)	ASL (%)	Ext (%)	Ash (%)
Wheat straw	–	32.8	26.3	3.6	2.4	13.1	0.7	17.9	4.1
T1	56.05	29.79	8.76	0.19	0.78	8.01	0.63	–	–
T2	40.06	25.78	4.14	0.04	0.28	4.73	0.32	–	–
T3	44.96	29.47	4.05	ND	0.27	3.53	0.35	–	–
T4	55.56	26.55	10.65	0.28	0.96	6.86	0.61	–	–
T5	47.62	29.98	4.45	0.05	0.32	5.90	0.31	–	–
T6	43.61	30.08	2.20	ND	0.13	4.38	0.31	–	–
T7	55.00	31.54	7.93	0.05	0.62	6.34	0.54	–	–
T8	44.55	27.68	5.49	0.06	0.39	4.22	0.38	–	–
T9	43.27	29.30	1.93	ND	0.11	5.04	0.21	–	–

ND: No detected.

Table 3

Experimental results and S/N ratio for fractionation process, expressed as the cellulose retained in the solid (GR), the xylan hydrolysis degree (XH), the degree of delignification (DD), and the accessibility to the cellulosic solid residue (EH).

Run		GR (%)	S/N	HX (%)	S/N	DD (%)	S/N	EH (%)	S/N
Wheat Straw		–	–	–	–	–	–	16.22	–
T1		90.75	39.16	66.70	36.48	38.84	31.79	61.97	35.84
T2		78.54	37.90	84.25	38.51	63.88	36.11	65.26	36.29
T3		89.78	39.06	84.60	38.55	73.08	37.28	74.95	37.50
T4		80.89	38.16	59.49	35.49	47.66	33.56	52.67	34.43
T5		91.34	39.21	83.06	38.39	54.99	34.81	75.17	37.52
T6		91.64	39.24	91.62	39.24	66.61	36.47	79.40	38.00
T7		96.07	39.65	69.85	36.88	51.59	34.25	71.03	37.03
T8		84.34	38.52	79.13	37.97	67.80	36.62	68.90	36.76
T9		89.27	39.01	92.66	39.34	61.57	35.79	78.41	37.89
ANOVA: A ₁ B ₃ C ₁ D ₁	Predicted	91.75	39.27	90.98	39.24	59.90	35.10	77.67	37.87
	Experimental	92.71	39.34	88.02	38.89	58.30	35.31	80.68	38.14

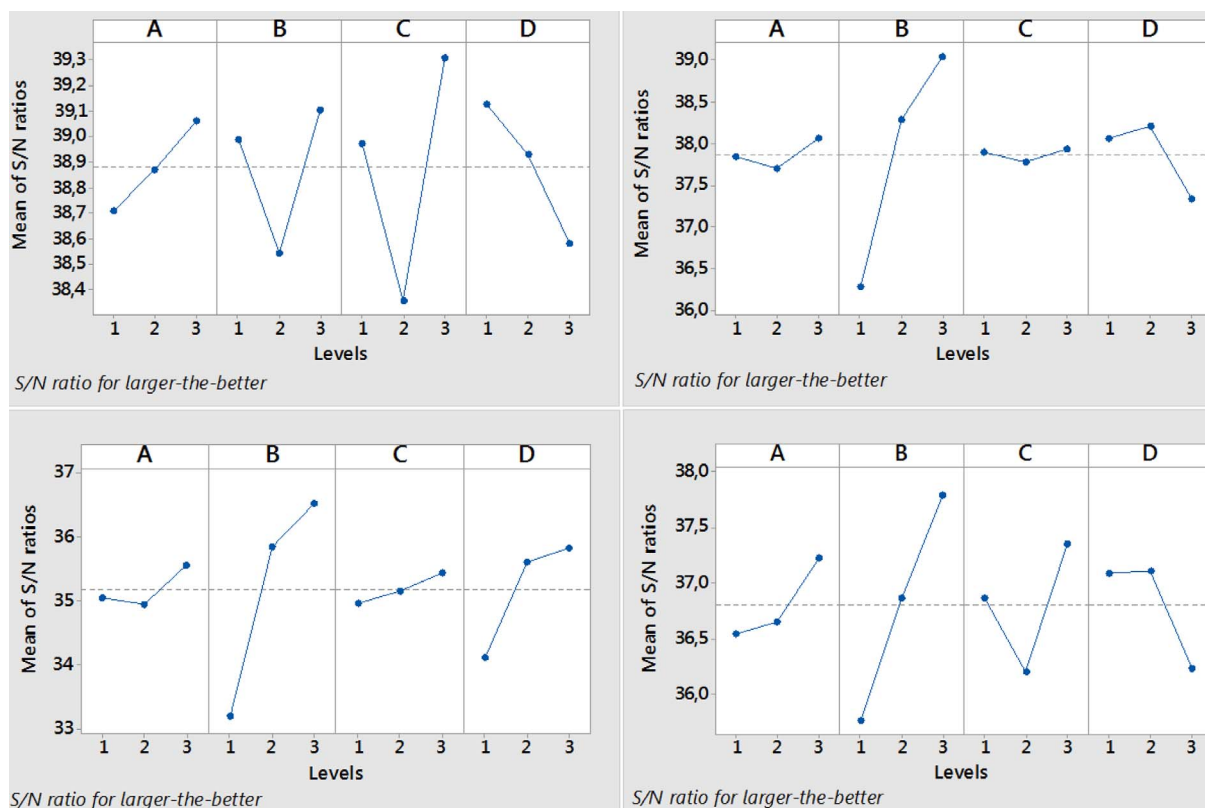
**Fig. 1.** Main effect plots for S/N ratios with *larger-the-better* criteria function of wheat straw fractionation. (a) GR. (b) XH. (c) DD and (d) EH.

Table 4
Experiments carried out for the comparison of DSA and EW pre-treatments.

Run	Ethanol (%) v/v)	L/S ratio	Catalyst	Temperature (°C)	Time (min)	H Factor
EW1*	33	20	–	170	90	1417
EW2	33	20	+	170	90	1417
EW3	33	20	+	170	60	958
EW4	33	20	+	160	45	316
EW5	33	20	+	150	90	255
EW6	33	20	+	150	60	173
EW7	33	20	+	150	45	132
EW8	33	20	+	130	90	39
EW9	33	20	+	130	60	26
EW10	33	20	+	130	45	20
DSA1	0	20	+	170	90	1417
DSA2	0	20	+	170	60	958
DSA3	0	20	+	160	45	316
DSA4	0	20	+	150	60	173
DSA5	0	20	+	150	45	132
DSA6	0	20	+	130	60	26

EW: Ethanol-Water; DSA: Diluted sulfuric acid; Catalyst: 1% H₂SO₄; *: Without catalyst. A 33% (v/v) of ethanol corresponds to 28.8% (w/w).

with the presence of silica as a major mineral component of straws and the great influence of fertilizer application in herbaceous biomass crops (Fengel and Wegener, 1989).

3.2. Optimization of operating conditions of EW fractionation

Wheat straw samples were fractionated with an EW mixture using as catalyst 1% H₂SO₄ (on dry wheat straw), following the experimental orthogonal design shown in Table 1. The results obtained for the treated solids are given in Table 2; in this table, the values of the SR, the polysaccharide composition (glucan, xylan, arabinose and acetic groups) and the lignin content (AIL and ASL) are shown.

The cellulose yield of the EW pre-treatment is expressed as the glucans retained in the solid, GR, and the quality of this fractionation method is measured as both the capacity to obtain high values of XH and DD. Finally, the accessibility to the cellulosic solid residue to be enzymatically hydrolyzed to glucose is measured by means of the EH. The values of these four parameters are shown in Table 3. The EW pre-treatment is a good method for the fractionation of wheat straw and, under suitable conditions (runs T3 or T6), the solid is enriched in cellulose while most of the hemicellulose and lignin are removed. However, it is unclear if all the four parameters involved in the fractionation of wheat straw have any significant effect on these results. To clarify this point, the S/N ratios for GR, XH, DD and EH were calculated, according to Eq. (2) for each one of the responses at different levels. These values are also given in Table 3, for each response and with the criteria *larger-the-better*. In the case of GR, the strongest influence was given by

the L/S ratio for the other three responses (XH, DD and EH), the temperature is the factor that always showed the strongest effect, while the effects of ethanol content, time and L/S ratio were moderate.

In the plots given in Fig. 1, it can be seen the optimum values of the factors, being: A₃B₃C₃D₁, for GR, while for XH, DD and EH are A₃B₃C₃D₂. To point out the statistical significance of the different factors on the EW pre-treatment, ANOVA was performed assuming a 90% confidence level ($p \leq 0.1$). Firstly, the contribution of each variable is determined for each response and only those with a perceptual contribution higher than 20% (CF > 20%) are considered to have a significant effect on the response. For the GR response, the factors with CF > 20% are L/S ratio (54.23%) and temperature (20.15%), although none of them is statistical significant, with $p = 0.103$ and $p = 0.313$, respectively. Temperature is the only variable with a significant effect on XH and EH, with CF = 89.46% ($p = 0.001$) and CF = 61.67% ($p = 0.056$), respectively. While the response DD is both dependent on temperature and on ethanol concentration, with CF = 75.39% ($p = 0.002$) and CF = 21.27% ($p = 0.018$), respectively. According to these results, the temperature is the variable with the greatest effect on the EW fractionation of wheat straw, which is consistent with a previous study (Wildschut, et al., 2013), although this work is carried out under different conditions regarding the physical solid pre-treatment.

3.3. Confirmatory experiments for the optimization of EW operating conditions

The Taguchi method permits to estimate the mean for each response, evaluated at the optimum levels of the variables, which results from ANOVA (A₁B₃C₁D₁), by using Eq. (9) (Taguchi et al., 2005; Nelabhotla et al., 2016).

$$M_p = Y + (A_1 - Y) + (B_3 - Y) + (C_1 - Y) + (D_1 - Y) \quad (9)$$

where M_p is the mean predicted, Y is the grand average of the responses (corresponding to the 9 experiments) and A_1 , B_3 , C_1 and D_1 are the average values of the responses with the variables at their respective optimum levels. To verify if the previously determined operating conditions are the optimum values for the fractionation of wheat straw, several runs were performed under these conditions and the responses compared with the estimation obtained by Eq. (9).

Table 3 shows the comparison of the experimental and predicted results obtained for GR, XH, DD and EH using optima operating conditions. As can be seen, the differences between experimental and predicted model values are relatively small for two responses: 10.5% for XH and 3.3% for DD, but important for other two: 25.5% for GR and 38.3% for EH.

These conditions optimize EH value, but only taking into account the effect of temperature, maintaining the lowest level of the other variables (A₁B₃C₁D₁). Under these conditions, the experimental responses are also similar to their predicted values, with differences

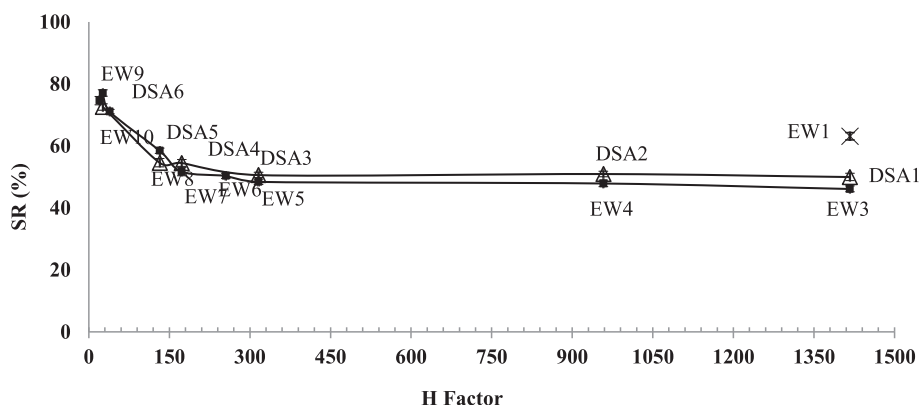


Fig. 2. SR (%) as function of H factor by DSA (Δ), EW pre-treatment without catalyst (x) and EW pre-treatment with catalyst (■).

Table 5
Chemical characterization of the solid fractions obtained by the DSA and EW pre-treatments (% dry weight).

Experiment	H Factor	SR (%)	Gln (%)	Xln (%)	Ara (%)	AG (%)	AIL (%)
EW10	20	74.63	31.65	20.7	2.15	0.96	9.88
EW9	26	77.08	30.65	19.8	2.09	1.99	9.87
EW8	39	71.13	30.01	17.0	1.96	1.70	8.14
EW7	132	58.49	29.60	14.6	0.98	1.20	6.55
EW6	173	51.74	29.41	11.1	0.63	0.80	5.69
EW5	255	50.37	30.32	6.1	0.41	0.59	5.35
EW4	316	48.46	29.41	5.4	0.29	0.71	4.46
EW3	958	47.9	28.87	5.4	0.29	0.57	4.41
EW2	1417	46.2	29.13	4.3	0.19	0.43	4.18
EW1*	1417	63.2	31.27	10.2	0.38	0.88	8.52
DSA6	26	72.59	25.39	14.68	0.72	1.77	11.67
DSA5	132	54.60	25.44	7.72	0.27	0.82	10.56
DSA4	173	54.53	25.68	7.22	0.15	0.67	9.99
DSA3	316	50.64	27.98	4.59	0.09	0.43	9.33
DSA2	958	50.99	28.75	3.42	0.05	0.43	9.18
DSA1	1417	50.02	29.86	3.31	0.00	0.37	8.45

* Without catalyst.

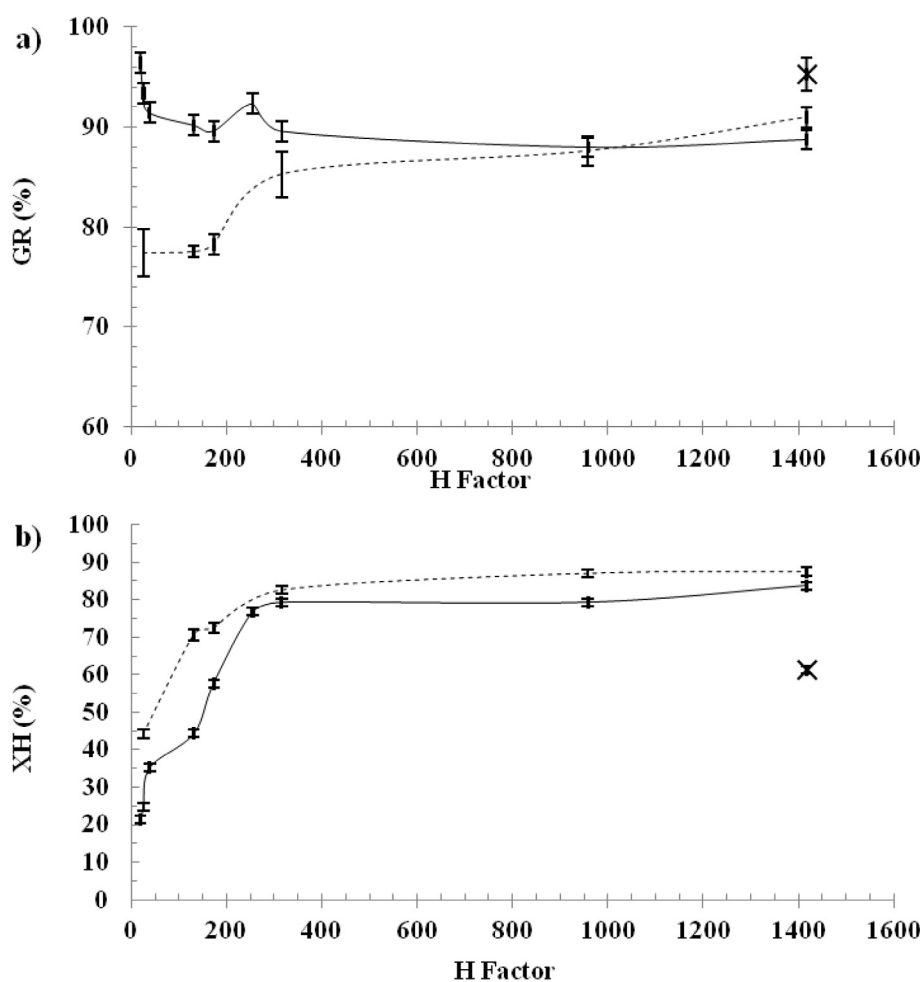


Fig. 3. GR (a) and XH (b) for the materials obtained by EW (—) and DSA (---) pre-treatment vs energy input (X: without catalyst).

between 1.0% (GR) and a maximum of 3.0% (XH and EH). However, the ANOVA derived conditions are not so good to explain the DD response, because the predicted maximum (59.90%) is far from the maximum value given by the Taguchi experimental design (73.08%). This can be due to the fact that DD is also dependent of the ethanol concentration.

Accordingly, the rest of the study has been made fixing the C factor (L/S ratio) at its lowest level (20) and the D factor (ethanol content) at

its intermediate level (0.33).

3.4. Comparison between DSA and EW pre-treatments

Once fixed the operating conditions of L/S ratio and the content of ethanol in the hydro-alcoholic liquor to establish the more favorable conditions in the EW pre-treatment, several runs were carried out in order to compare it with the DSA pre-treatment. The runs performed

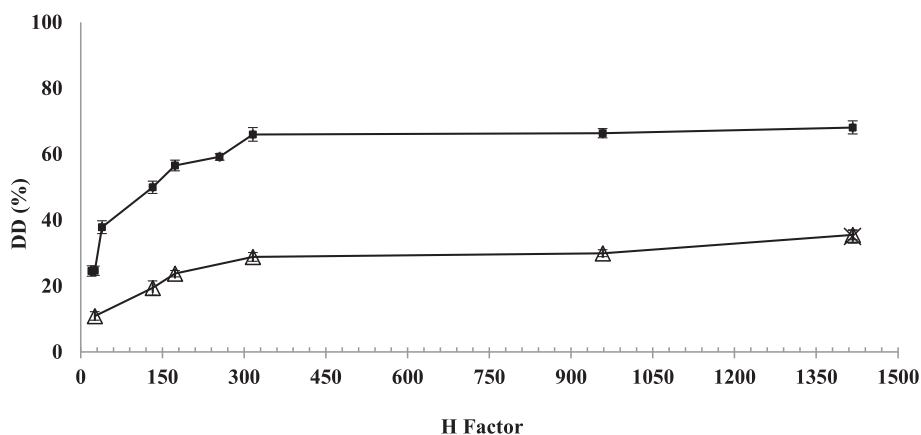


Fig. 4. DD (%) as function of H factor by DSA (Δ), EW pre-treatment without catalyst (X) and EW pre-treatment with catalyst (■).

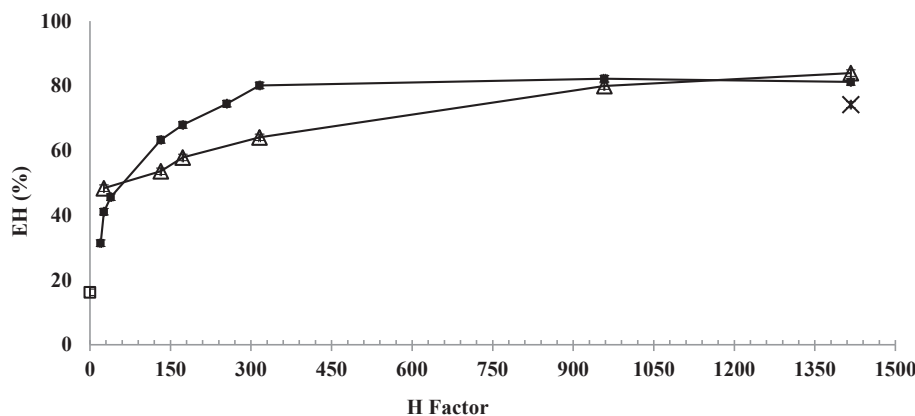


Fig. 5. Glucose yield (EH, %) as function of H factor by raw material (□) (what straw without pre-treatment), DSA (Δ), EW pre-treatment without catalyst (X) and EW pre-treatment with catalyst (■).

are shown in Table 4, with the experimental operating conditions and also the amount of energy involved, given by the H factor; these runs cover a broad range of energy input, represented by H factor (from 20 to 1417).

3.4.1. SR and recovery of structural components as function of H factor

DSA and EW pre-treatment of lignocellulose have different characteristics. The first promotes the hydrolysis of the non-cellulosic polysaccharides, while the second acts as a combination of hemicelluloses hydrolysis and lignin dissolution that improves the biomass delignification and further cellulose hydrolysis.

The comparative yields in cellulose-rich solids after both treatments can be seen in Fig. 2, which represents the amount of SR under different energy inputs. As it was expected, the yield decreases as the energy increases due to increased delignification and xylan hydrolysis (Wildschut, et al., 2013; Salapa et al., 2017). However, from a determined value of the energy that corresponds to H factor in the range of 300–400, the solids yield remains almost constant. The most relevant fact is that DSA always gives slightly higher solids recovery than EW, only noticeable at higher energy inputs.

After the pre-treatment, the polysaccharide composition (glucan, xylan, arabinose and acetic groups) and the lignin content (AIL and ASL) was determined (Table 5). The pre-treatment quality is also measured as the yield in cellulose expressed as the content of glucans retained in the solids (GR), in addition to the ability to obtain a high XH, DD and EH.

The behavior of the main lignocellulose components is also different for both pre-treatments. The main polysaccharide, cellulose, is retained in the solid independently of the intensity of the treatment as can be observed in Fig. 3a. Both pre-treatments, especially in the range of moderate-high H factors, obtain similar cellulose retention: about a

90% of the initial cellulose. However, the EW pre-treatment is a little more selective and the cellulose recovered is more concentrated in the EW solid fraction, until a 63%, in comparison with a 60% in the DSA solid fraction (data not shown). EW fractionation is able to produce this cellulose-rich solid at relatively low energy input (H Factor value of 170).

Hemicelluloses are dissolved with more efficiency by the DSA pre-treatment, which removes up to 87% xylans under the most severe conditions (H Factor of 1417). EW pre-treatment removes almost the same percentage of hemicelluloses, around 83% of xylans removal at similar energy input (H Factor 1417), but it is not so efficient at low energy, as can be seen in Fig. 3b. The curves have an inflexion point in the range of H factor from 173 to 255, corresponding to the temperature rise from 130 to 150 °C, which can be associated to the dissolution of hemicelluloses. As the only difference between the two pre-treatments is the liquid medium, differences in xylans removal are explained by a better solubility of the xylans in acid water, due to their hydrolysis (at least, in part), than in the EW media (Neureiter et al., 2002; Camesasca et al., 2015; Ji et al., 2017).

Therefore, the lower solid yield associated to the EW pre-treatment only can be a consequence of a more intense lignin removal, as it is shown in Fig. 4. When comparing both types of pre-treatments, we can observe that the lignin content varies between 4 and 12%, always with the lowest value of lignin in the pulps obtained in the EW pre-treatment. While the DSA treatment only removes a 35.51% of the initial lignin under the most severe conditions (DSA1), around 68% of delignification is achieved with similar conditions when EW pre-treatment was used (EW2). Moreover, delignification with DSA hardly changes with the energy input; in fact, similar lignin removals were measured in a wide interval of the energy input (H Factor 132 to 1417). However, EW is much more effective for straw delignification: a delignification of

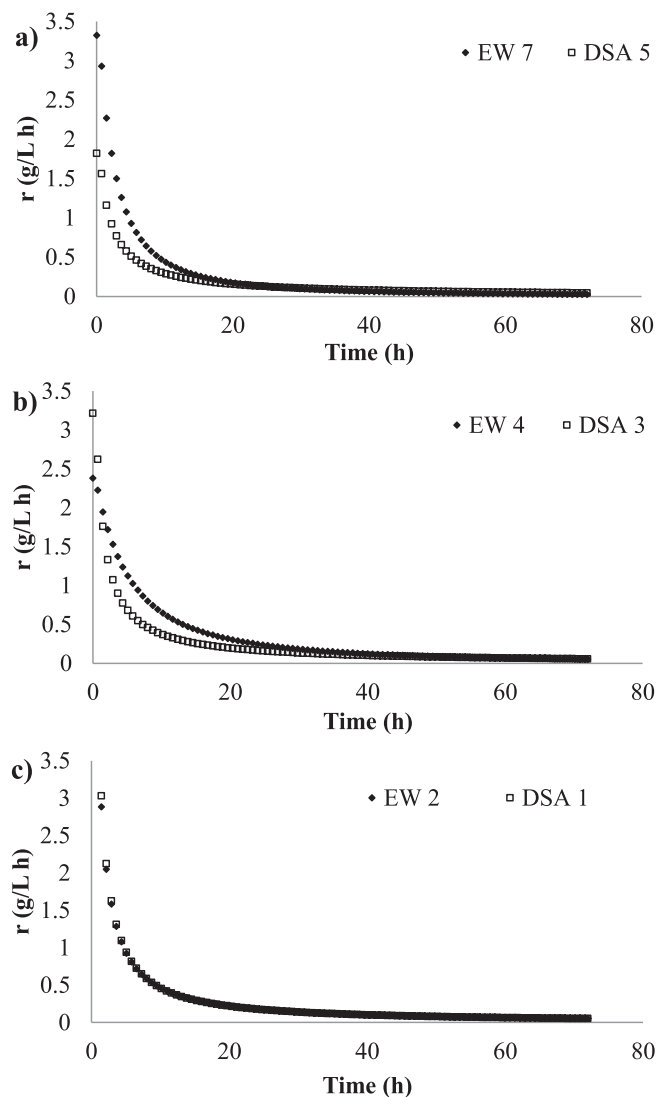


Fig. 6. Comparison of conversion rates of cellulose into glucose at different energy levels. a) Materials obtained with a lower energy input (H factor near 130). b) Materials obtained with an intermediate energy input (H factor near 300). c) Materials obtained with a high energy input (H factor near 1400). EW pre-treatment (◆) and DSA (□).

more than the 50% is obtained even under moderate energy inputs (H Factor of 316). This superior delignification can favor the subsequent enzymatic saccharification step of the EW-solids. Therefore, the acid medium by itself is not a favorable environment to promote delignification, while the addition of ethanol, with the same amount of sulfuric acid, has more affinity for the lignin as pointed out by the solubility parameter, δ , theory (Hildebrand and Scott, 1950; Quesada-Medina et al., 2010).

3.4.2. Enzymatic hydrolysis test (EH)

Although solids with similar cellulose yields are obtained by both pre-treatments, EW and DSA, chemical composition of the solids presumably affects the response of the enzymatic saccharification. Fig. 5 shows the glucose produced by enzymatic hydrolysis as a function of the energy input for both treatments. A clear dependence of the glucose yield with the energy input and a different behavior between the EW and the DSA pre-treatments can be observed. EW pre-treatment is more efficient for a similar amount of energy and a solid easily hydrolyzed with high glucose yield is obtained with moderate energy input (H factor of 316). Additional energy inputs do not significantly increase the glucose production, which remains slightly above the 80% of the theoretical maximum yield. The DSA pre-treatment leads to similar glucose yield at high levels of energy input, while it is clearly more inefficient in the range of moderate-low energy input.

The reasons for this different behavior between both treatments are related with the different delignification capacity (Pan et al., 2005). It can be observed by comparison of Figs. 4 and 5 that the profile of glucose production is very similar to those of delignification, with a plateau from an H factor of 316 in the EW system and a linear behavior, with lower figures, for the DSA pre-treatment. Lignin is not only a physical barrier to avoid the access of enzymes to cellulose, it is also an inhibitor that adsorbs and retains enzymes (Wojtusik et al., 2017), reducing the hydrolysis rate that could be also a reason to explain the differences in glucose yield between both pre-treatments.

Whatever was the effect of lignin, barrier or inhibitor, its removal renders a cellulose more accessible to the action of hydrolytic enzymes. Therefore, it could be expected that *endo*-glucanases have more facility to split the cellulose chains into two fragments, which, in turn, would leave more substrate to the action of *exo*-glucanases and, finally, more cellobiose to produce glucose. Therefore, different glucose production rates would be observed for substrates with different delignification degree (as in the EW and DSA produced solids). This hypothesis can be supported by the results shown in Fig. 6; this figure shows the enzymatic hydrolysis rates of the pretreated wheat straw at three different energy inputs. For a low-moderate H factor (from 132 to 316), the solids from EW and DSA processes show clear differences in their hydrolysis rates, being the EW substrates much easier to hydrolyze in the first stages of the hydrolysis and both solids showing progressively similar rates after 20–25 h of hydrolysis. In pre-treatments with greater energy inputs (H factor 1417) there are no significant differences in the solids hydrolysis rate and both profiles are overlapped (Fig. 6c). This behavior is explained by the more efficient delignification capacity of the EW pre-treatment, especially at low energy inputs where the DSA is less effective. A more intense lignin removal would remove this obstacle and facilitate the enzyme adsorption on the cellulose surface, but this effect would not be noticeable at high energy levels where most of the lignin would be removed from the solids.

Several works can be found in the literature about the use of the EW pre-treatment to improve the conversion from cellulose to glucose with the same or similar raw materials. Table 6 shows the pre-treatment conditions and glucose yields found by other authors, using more severe

Table 6

Summary of recent reported organosolv pre-treatment of different biomass feedstocks for improving enzymatic hydrolysis.

Reference	Material	Pre-treatment	Conditions	H factor	EH
Huijgen et al. (2011)	Wheat straw	EW + H ₂ SO ₄	190 °C, 180 min	13434	99%
Huijgen et al. (2011)	Wheat straw	EW	190 °C, 180 min	13434	44%
Obama et al. (2012)	Miscanthus	Enzyme + EW	170 °C, 60 min	958	75%
Pérez-Cantú et al. (2013)	Rye straw	EW	180 °C, 120 min	4184	93%*
Reisinger et al. (2014)	Wheat bran	EW	180 °C, 30 min	1107	75%
Chen et al. (2015)	Wheat straw	EW + H ₂ SO ₄	190 °C, 60 min	4590	70–75%*
Chen et al. (2015)	Wheat straw	EW	220 °C, 20 min	13490	65%*
Salapa et al. (2017)	Wheat straw	EW	180 °C, 60 min	2133	89%

EH: referred to the raw material glucans content; * referred to the pulp glucans content.

conditions than those proposed in this work. As can be observed, the H Factor calculated from their conditions is, in most of the cases, considerably higher than the maximum used in this work, in which we are able to obtain high glucose yield (80.1%) at an H Factor as low as 316.

4. Conclusions

The EW process has been studied as a pre-treatment of wheat straw. Taguchi experimental design was used to determine the effect of the main variables (time, temperature, L/S ratio and ethanol percentage). Only temperature has significant effect on the EW fractionation. The best conditions were: $t = 60$ min, $T = 190$ °C, $L/S = 20$ L/kg and 25% ethanol (v/v). Comparison of the DSA and EW pre-treatments, in terms of glucose yield, showed that EW is more efficient, mainly at low energy inputs, to obtain a cellulose-rich solid easy to be enzymatically hydrolyzed to glucose. The more intense delignification produced by the EW is responsible for the higher glucose yields.

Acknowledgements

The authors wish thank to MINECO for funding this study via Projects CTQ2013-45970-C2, Madrid Regional Government for funding via Project RETO PROSOST P2013-MAE2907 and Chilean Ministry of Education – CONICYT (Becas Chile).

References

- Atchison, J.E., 1993. Data on non-wood plant fibers, pulp and paper manufacture. In: Hamilton, F., Leopold, B. (Eds.), *Secondary Fibers and Non-Wood Pulping*. TAPPI CPPA, Atlanta, pp. 4–16.
- Bose, P.K., Deb, M., Banerjee, R., Majumder, A., 2013. Multi objective optimization of performance parameters of a single cylinder diesel engine running with hydrogen using a Taguchi-fuzzy based approach. *Energy* 63, 375–386.
- Bozell, J.J., Astner, A., Baker, D., Biannic, B., Cedeno, D., Elder, T., Hosseinaei, O., Delbeck, L., Kim, J., Young, T., 2014. Integrating separation and conversion—conversion of biorefinery process streams to biobased chemicals and fuels. *Bioenergy Res.* 7 (3), 856–866.
- Camasasca, L., Ramírez, M.B., Guigou, M., Ferrari, M.D., Lareo, C., 2015. Evaluation of dilute acid and alkaline pretreatments, enzymatic hydrolysis and fermentation of napier grass for fuel ethanol production. *Biomass Bioenergy* 74, 193–201.
- Chen, H., Zhao, J., Hu, T., Zhao, X., Liu, D., 2015. A comparison of several organosolv pretreatments for improving the enzymatic hydrolysis of wheat straw: substrate digestibility, fermentability and structural features. *Appl. Energy* 150, 224–232.
- Fengel, D.Y., Wegener, G., 1989. *Wood, Chemistry, Ultrastructure and Reactions*. In: Walter de Gruyter. (Ed.), Berlin-New York, pp. 26–59.
- García, A., Alriols, M.G., Llano-Ponte, R., Labidi, J., 2011. Energy and economic assessment of soda and organosolv biorefinery processes. *Biomass Bioenergy* 35 (1), 516–525.
- Gütsch, J.S., Nousiainen, T., Sixta, H., 2012. Comparative evaluation of autohydrolysis and acid-catalyzed hydrolysis of Eucalyptus globulus wood. *Bioresour. Technol.* 109, 77–85.
- Hergert, H.L., Pye, E.K., 1992. In: *Proceed. TAPPI Solvent Pulping Symp.*, Boston, MA, p. 9.
- Hildebrand, J.H., Scott, R.L., 1950. *The Solubility of Nonelectrolytes*, third ed. Reinhold, New York.
- Huijgen, W.J., Smit, A.T., Reith, J.H., Uil, H.D., 2011. Catalytic organosolv fractionation of willow wood and wheat straw as pretreatment for enzymatic cellulose hydrolysis. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86 (11), 1428–1438.
- Ji, X., Ma, H., Tian, Z., Lyu, G., Fang, G., Chen, J., Saeed, H.A., 2017. Production of xylose from diluted sulfuric acid hydrolysis of wheat straw. *BioResources* 12 (4), 7084–7095.
- Kumar, R.S., Sureshkumar, K., Velraj, R., 2015. Optimization of biodiesel production from Manilkara zapota (L.) seed oil using Taguchi method. *Fuel* 140, 90–96.
- Lai, C., Tu, M., Shi, Z., Zheng, K., Olmos, L.G., Yu, S., 2014. Contrasting effects of hardwood and softwood organosolv lignins on enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Bioresour. Technol.* 163, 320–327.
- Mood, S.H., Golfeshan, A.H., Tabatabaei, M., Jouzani, G.S., Najafi, G.H., Gholami, M., Ardjmand, M., 2013. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Rev.* 27, 77–93.
- Nelabhotla, D.M., Jayaraman, T.V., Asghar, K., Das, D., 2016. The optimization of chemical mechanical planarization process-parameters of c-plane gallium-nitride using Taguchi method and grey relational analysis. *Mat. Des.* 104, 392–403.
- Neureiter, M., Danner, H., Thomasser, C., Saidi, B., Braun, R., 2002. Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. In: *Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Humana Press, pp. 49–58.
- Ni, Y., Hu, Q., 1995. Alcell® lignin solubility in ethanol-water mixtures. *J. Appl. Polym. Sci.* 57 (12), 1441–1446.
- Obama, P., Ricochon, G., Muniglia, L., Brosse, N., 2012. Combination of enzymatic hydrolysis and ethanol organosolv pretreatments: Effect on lignin structures, delignification yields and cellulose-to-glucose conversion. *Bioresour. Technol.* 112, 156–163.
- Pan, X., Arato, C., Gilkes, N., Gregg, D., Mabey, W., Pye, K., Xiao, Z., Zang, X., Saddler, J., 2005. Biorefining of softwoods using ethanol organosolv pulping: Preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products. *Biotechnol. Bioeng.* 90 (4), 473–481.
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour. Technol.* 74 (1), 25–33.
- Parawira, W., Tekere, M., 2011. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulosic hydrolysates for ethanol production: review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 31 (1), 20–31.
- Perez-Cantu, L., Schreiber, A., Schütt, F., Saake, B., Kirsch, C., Smirnova, I., 2013. Comparison of pretreatment methods for rye straw in the second-generation biorefinery: effect on cellulose, hemicellulose and lignin recovery. *Bioresour. Technol.* 142, 428–435.
- Quesada-Medina, J., López-Cremades, F.J., Olivares-Carrillo, P., 2010. Organosolv extraction of lignin from hydrolyzed almond shells and application of the value theory. *Bioresour. Technol.* 101 (21), 8252–8260.
- Ravindran, R., Jaiswal, A.K., 2016. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: challenges and opportunities. *Bioresour. Technol.* 199, 92–102.
- Reisinger, M., Tirpanalan, Ö., Huber, F., Kneifel, W., Novalin, S., 2014. Investigations on a wheat bran biorefinery involving organosolv fractionation and enzymatic treatment. *Bioresour. Technol.* 170, 53–61.
- Rocha, G.J., Silva, V.F., Martín, C., Gonçalves, A.R., Nascimento, V.M., Souto-Maior, A.M., 2013. Effect of xylan and lignin removal by hydrothermal pretreatment on enzymatic conversion of sugarcane bagasse cellulose for second generation ethanol production. *Sugar Tech.* 15 (4), 390–398.
- Ross, P.J., 1996. *Taguchi Techniques for Quality Engineering*, second ed. McGraw-Hill, New York.
- Roy, R.K., 1990. *A Premier on the Taguchi Method*. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Salapa, I., Katsimpouras, C., Topakas, E., Sidiras, D., 2017. Organosolv pretreatment of wheat straw for efficient ethanol production using various solvents. *Biomass Bioenergy* 100, 10–16.
- Sameni, J., Krigstin, S., Sain, M., 2017. Solubility of Lignin and Acetylated Lignin in Organic Solvents. *BioResources* 12 (1), 1548–1565.
- Sharazi, A.M., van Heiningen, A., 2017. Ethyl xylosides formation in SEW (AVAP®) fractionation of sugarcane straw; implications for ethanol and xylose recovery. *Holzforchung* 71 (12), 951–959.
- Singh, J., Suhag, M., Dhaka, A., 2015. Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: a review. *Carbohydr. Polym.* 117, 624–631.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., 2006. Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples. National Renewable Energy Laboratory, Golden CO.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D., 2008. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. National Renewable Energy Laboratory, USA.
- Taguchi, G., Chowdhury, S., Wu, Y., 2005. In: *Taguchi's Quality Engineering Handbook*. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, pp. 1736.
- Vroom, K.E., 1957. The “H” factor: a means of expressing cooking times and temperatures as a single variable. *Pulp Pap. Mag.* 58 (3), 228–231.
- Wildschut, J., Smit, A.T., Reith, J.H., Huijgen, W.J., 2013. Ethanol-based organosolv fractionation of wheat straw for the production of lignin and enzymatically digestible cellulose. *Bioresour. Technol.* 135, 58–66.
- Wojtusik, M., Villar, J.C., Zurita, M., Ladero, M., Garcia-Ochoa, F., 2017. Study of the enzymatic activity inhibition on the saccharification of acid pretreated corn stover. *Biomass Bioenergy* 98, 1–7.
- Young, R.A., 1994. Comparison of the properties of chemical cellulose pulps. *Cellulose* 1 (2), 107–130.
- Zhao, X., Cheng, K., Liu, D., 2009. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82 (5), 815–827.

PUBLICACIÓN II:

Autores: Priscilla Vergara, Miguel Ladero, Félix García-Ochoa, Juan C. Villar.

Título: Valorisation of *Cynara Cardunculus* crops by ethanol-water treatment: Optimization of operating conditions.

Revista: Industrial Crops and Products. 124 (2018) 856-862.

Índice de impacto: 4.191

Categoría: Materiales de origen biológico a partir de cultivos.

Sub-categoría: Fibras y compuestos de fibra.

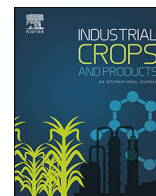
Resumen: El pre-tratamiento con mezclas de etanol-agua (EW), ha sido aplicado para estudiar la valorización de *Cynara Cardunculus L.* (cardo), como una materia prima apta para ser usada en biorrefinería. El cardo es una planta perenne totalmente adaptada a suelos de baja fertilidad y podría ser una solución para mejorar el suministro de biomasa en áreas rurales con tierras marginales. El propósito de este estudio fue optimizar el fraccionamiento de la biomasa de cardo, maximizando el rendimiento de glucosa en la posterior sacarificación enzimática. Las condiciones operativas se han optimizado utilizando el enfoque estadístico de Taguchi (L_9), para las respuestas: recuperación de glucanos, rendimiento de hidrólisis de los xilanos, rendimiento de deslignificación y rendimiento de hidrólisis enzimática. Las variables estudiadas han sido: tiempo, temperatura, relación líquido/sólido (L/S) y contenido de etanol.

El cardo (100 g) se fraccionó bajo variadas condiciones utilizando licor EW, suplementado con 1% p/p (en cardo seco) de H_2SO_4 como catalizador. Cada fracción sólida pre-tratada fue filtrada al vacío y lavada exhaustivamente con agua destilada y posteriormente, homogeneizada durante 5 min en un desintegrador de laboratorio. Las fracciones líquidas se almacenaron para un análisis adicional.

Las mejores resultados se logran con los valores máximos probados de tiempo, temperatura y relación L/S (120 min, 190 °C y 30 L/kg, respectivamente) y el nivel intermedio para la concentración de etanol (33 %). Sin embargo, la temperatura es la variable más influyente y, con un aporte energético moderado (60 min, 190 °C, 20 L/kg y 25 % de etanol), el cardo

retiene la mayor parte de los glucanos (> 97 %), mientras que cantidades significativas de xilanos (> 68 %) y lignina (> 58 %) se eliminan, lo que da como resultado un alto rendimiento de glucosa (aproximadamente 72 %) en el proceso de sacarificación enzimática posterior. Por lo tanto, el pre-tratamiento EW conduce a rendimientos de glucosa similares en comparación con otros pre-tratamientos, pero con un menor gasto de energía.

Enlace: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669018307635>
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.064>



Valorization of *Cynara Cardunculus* crops by ethanol-water treatment: Optimization of operating conditions

Priscilla Vergara^{a,b}, Miguel Ladero^b, Felix García-Ochoa^b, Juan C. Villar^{a,*}

^a Laboratory of Cellulose and Paper, Forest Research Center – INIA, Ctra. de La Coruña km 7.5, 28040 Madrid, Spain

^b Chemical and Materials Engineering Department, Faculty of Chemistry, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Marginal lands
Cynara cardunculus
Fractionation
Ethanol-Water treatment

ABSTRACT

Ethanol-water (EW) process, an efficient and low energy consumption method for lignocellulose fractionation, has been applied to the valorization of *Cynara cardunculus* (cardoon) as an integrated biorefinery raw material. Cardoon is a perennial plant fully adapted to low fertility soils and could be a solution to improve the biomass supply in rural areas with marginal lands. The purpose of this study is to optimize the fractionation of cardoon biomass, maximizing glucose yield in the subsequent enzymatic saccharification. Operational conditions have been optimized using Taguchi statistical approach, being the responses: recovery of glucans, hydrolysis yield of xylans, delignification yield and enzymatic hydrolysis rate. The variables studied have been: time, temperature, liquid/solid (L/S) ratio and ethanol concentration; each variable was studied at three levels. The best treatment conditions are achieved at the maximum tested values for time, temperature and L/S ratio (120 min, 190 °C and 30 L/kg, respectively), and the intermediate level for the ethanol concentration (33%). Nevertheless, temperature is the most influential variable and, with a moderate energy input (60 min, 190 °C, 20 L/kg and 25% of ethanol), cardoon retains most of the glucans (> 97%), while significant amounts of xylans (> 68%) and lignin (> 58%) are removed, resulting in a high glucose yield (c.a. 72%) in the subsequent enzymatic saccharification process. Therefore, EW treatment leads to similar glucose yields if compared to other pre-treatments, but at a fraction of the energy input.

1. Introduction

In recent decades, the development of alternative energy sources to replace or supplement fossil fuels has greatly increased. Lignocellulosic biomass is a promising feedstock for biorefineries to produce alternative energy, chemicals and materials due to its high content of polysaccharides, a very high potential volume and a reduced cost (Zhang et al., 2016a; Zhao et al., 2017). This biomass has a rigid structure composed of cellulose microfibrils protected by a net of hemicelluloses and lignin. Cellulose is the most abundant and valuable component of lignocellulosic biomass, but its transformation into glucose by cellulolytic enzymes is inhibited by the hemicellulose-lignin matrix, and by the partial crystallinity of cellulose itself (Pu et al., 2013). Therefore, biomass pre-treatments are mandatory to make cellulose reactive and accessible to the enzymes (Parawira and Tekere, 2011; Perez-Cantu et al., 2013; Ravindran and Jaiswal, 2016) by removing hemicelluloses and lignin, while increasing pore volume and surface area, and reducing the cellulose crystallinity.

Due to logistic and socioeconomic reasons, biorefineries must be

installed in rural areas to reduce costs due to biomass transportation, while favoring the sustainable development of these regions. However, in marginal lands, lignocellulose availability is scarce and only a few crops and other plants could be adapted to produce biomass. The commercial exploitation of industrial crops needs of a continuous biomass supply of standard quality. Among the factors that guarantee this quality are: the selection of species, its adaptation to soil and climate, and the optimization of crop production. One of these rare species are *Cynara cardunculus* L., a perennial plant fully adapted to ecosystems with water stress, with large temperature variations and unproductive and stony soils that are common in Mediterranean countries (Abbate and Patanè, 1996; Curt et al., 2002). After harvesting, cardoon biomass has low moisture, which is an evident advantage for its transport, storage and conservation (Gominho et al., 2001).

Cardoon has been tested as a raw material for different industrial applications: as a solid fuel, for the production of seed oil, biodiesel, paper pulp, green forage and pharmacologically active compounds (Fernández et al., 2006). The high productivity of cardoon biomass reaches values in the range of 14–20 t·yr⁻¹·ha⁻¹, and its chemical

* Corresponding author.

E-mail address: villar@inia.es (J.C. Villar).

composition makes it very attractive for the lignocellulosic biorefinery (Fernández, 1998; Shatalov and Pereira, 2011). The necessary pre-treatment of cardoon could be made by steam explosion, hot water extraction and diluted acid hydrolysis. These are usual methods to remove hemicelluloses and one lignin fraction, as well as inhibitors for enzymes and microorganisms such as furfural and acetic and formic acids (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000). Lignin condensation also occurs (Villar et al., 1997) and the condensed lignin acts as inhibitor for cellulases (Wojtusik et al., 2017). Diluted acid hydrolysis is the most frequent pre-treatment method at industrial scale because of its low cost and simplicity. However, this method has some drawbacks, as it promotes the formation of acetic acid, furfural, hydroxymethylfurfural (HMF) and phenolics, products that act as inhibitors of cellulases. Moreover, its capacity to remove lignin, other known inhibitor, is scarce.

The organosolv process (organic solvent pre-treatment) has been used to produce de-lignified pulps as an alternative to the predominant Kraft pulping method. Two processes have been implemented at pilot or industrial scales, ALCELL (ethanol-water) and ASAM (alkali-sulfite-anthraquinone-methanol), although without success in replacing the Kraft process (Young, 1994). However, when the objective is not the production of papermaking fibres, a similar process using a mixture solvent-water allows results in a solid fraction containing cellulose with high purity and minimum degradation. Moreover, the surface area of cellulose is increased, with the consequent higher enzyme accessibility during the subsequent enzymatic hydrolysis. In addition, a high quality lignin fraction is produced; it can be employed to obtain several medium to high added-value compounds. Also a considerable fraction of hemicellulose can be separated, while the solvent can be recovered by distillation (Zhao et al., 2017). Several water-soluble organic solvents have been tested: acids, peracids, ethers, ketones, alcohols and phenols. Ethanol is the most usual for the pre-treatment of biomass, because of its low price and toxicity, its miscibility with water, and its easy recovery (Chaves-López et al., 2018; Choi et al., 2018; Salapa et al., 2017; Zhang et al., 2018; Zhang et al., 2016a; Zhang et al., 2016b). In the organosolv pre-treatment, the breakage of the lignin-carbohydrate bonds causes delignification and simultaneous removal of hemicelluloses. Acetyl groups are liberated from the hemicelluloses and the resulting acetic acid also catalyzes hemicellulose hydrolysis (Zhao et al., 2009). However, additional acids, as sulfuric or hydrochloric, are added to promote the hydrolysis of hemicelluloses (Hergert and Pye, 1992; Vergara et al., 2018). To be sustainable, ethanol recovery in the EW pre-treatment is essential. However, the xylose produced in the hydrolysis with EW mixtures reacts with ethanol producing ethyl-xylosides; while similar reactions occur affecting other C5 and C6 sugars. These reactions can remove around 1 or 2% of the initial ethanol (Sharazi and Van Heiningen, 2017) and, accordingly, must be minimized.

Thus, EW fractionation could be an effective pre-treatment for cardoon to produce sugars and lignin (Chen et al., 2015; Wildschut et al., 2013). In any case, this treatment must be optimized to avoid excessive energy consumption and to obtain high quality fractions. Several parameters affect lignocellulose EW fractionation: time and temperature of reaction, L/S ratio and percentage of ethanol. The values of these variables should be carefully chosen to obtain a selective cardoon fractionation at the lowest energy input possible.

This work explores the possibility of employing EW fractionation process as pre-treatment in the valorization of *C. cardunculus* stalks, an alternative crop that would boost the implementation of biorefineries in marginal lands. The aim of this study is to optimize the selective pre-treatment of *C. cardunculus* by EW process to maximize the glucose yield in the subsequent enzymatic saccharification. For this purpose, the influence of reaction time, temperature, L/S ratio and percentage of ethanol in the liquor will be optimized through a Taguchi-type design of experiments.

Table 1

Chemical composition of cardoon employed (dry weight basis).

Compounds	% w/w
Polysaccharides	53.10
Glucan (Gln)	33.27 ± 0.05
Xylan (Xln)	16.19 ± 0.05
Arabinan (Ara)	0.46 ± 0.01
Acetyl groups (A.G.)	3.18 ± 0.01
Lignin (Klason)	17.63
Acid insoluble lignin (AIL)	14.32 ± 0.86
Acid soluble lignin (ASL)	3.31 ± 0.17
Extractives	18.96 ± 0.63
Ash	6.50 ± 0.19

2. Materials and methods

2.1. Raw material

The raw material used for this study was *Cynara cardunculus* provided by the School of Agricultural, Food and Biosystems Engineering (Polytechnic University of Madrid), obtained from an experimental plantation (European Union AIR Programme) located at Madrid and harvested six weeks before the beginning of the pre-treatments. The cardoon was homogenized and air-dried until constant moisture (13.3% w/w) and then stored in plastic bags at 4 °C until use. The chemical composition of cardoon was analyzed (Section 2.2), being the results summarized in Table 1.

2.2. Ethanol-water (EW) treatment procedure and analytical methods

Cardoon was fractionated under several conditions using an EW liquor and adding 1% w/w (on dry cardoon) of sulfuric acid as catalyst. The experiments were carried out in a 6 L stainless steel reactor provided with a liquor recirculation loop, temperature control and liquor sampling. The reactor was loaded with 100 g of cardoon (dry basis) and the corresponding volume of EW liquor. At the end of the reaction process, the pretreated solid fraction was vacuum filtered and extensively washed with distilled water. Afterwards, it was homogenized for 5 min in a laboratory disintegrator MK IIIC (Messmer). The original liquor, or liquid fraction, was stored for further analysis.

The amount of energy involved in the pre-treatment has been calculated by using the H-factor or severity factor, given by Eq. (1), which integrates the pre-treatment temperature (T in K) and time (t in hours) into a single variable that is usually employed in the pulp industry to measure the energy input (Vroom, 1957), as follows:

$$H = \int_0^t e^{\left(43.2 - \frac{16115}{T}\right)} dt \quad (1)$$

The content of ash and moisture (%) of the raw material (cardoon) and of the pre-treated materials obtained were determined according to protocols NREL/TP-510-42622 (Sluiter et al., 2008c) and 42621 (Sluiter et al., 2008a), respectively. The composition (content of cellulose, hemicelluloses, lignin, and extractives in the solids) was determined (in duplicate) according to NREL/TP-510-42618 (Sluiter et al., 2008b) and 42619 (Sluiter et al., 2005). The raw material was subjected to two successive Soxhlet extraction steps (with water and ethanol), to remove polar low-molecular weight extractives, and the amount of water extractives reported was corrected for soluble ash removed. The sample was then dried, ground and sieved, to be subjected to two hydrolysis steps: (1) 72% (w/w) H₂SO₄ at 30 °C for 1 h, and (2) 4% (w/w) H₂SO₄ at 121 °C for 1 h. The acid-insoluble lignin (AIL) content was based on the amount of ash-free residue. Finally, the hydrolysate was analyzed for acid-soluble lignin (ASL, UV-VIS absorption at 205 nm). The concentration values retrieved were further employed to calculate the effect of the pre-treatment variables on the recovery of glucans (GR), hydrolysis of xylans (XH) and degree of delignification (DD), expressed

by the following Eqs. (2) to (4):

$$GR (\%) = \left(\frac{W_{Gp}}{W_{Go}} \cdot 100 \right) \quad (2)$$

$$XH (\%) = \left(1 - \frac{W_{Xp}}{W_{Xo}} \right) \times 100 \quad (3)$$

$$DD (\%) = \left(1 - \frac{W_{Lp}}{W_{Lo}} \right) \times 100 \quad (4)$$

Where W_{Gp} , W_{Xp} , and W_{Lp} are the glucan, xylan and lignin weight in the pre-treated cardoon (dry basis) and W_{Go} , W_{Xo} , and W_{Lo} are their values in the original (non-pretreated) raw material.

The solids recovery (SR) was determined gravimetrically after oven drying for 24 h at 105 °C and can be calculated according to NREL/TP-510-42621 (Sluiter et al., 2008a):

$$SR (\%) = \left(\frac{W_p}{W_o} \times 100 \right) \quad (5)$$

Where W_p is the dry weight of pretreated cardoon (g) and W_o is the dry weight of the original cardoon (g).

To determine the composition of the liquid fractions obtained after the pre-treatment an aliquot (1 mL) was filtered through a 0.45 mm membrane and used for direct HPLC determination of monosaccharides, acetic acid, furfural and hydroxymethylfurfural (HMF), as indicated afterwards.

2.3. Enzymatic hydrolysis (EH) assays

To measure the reactivity of the cellulosic solid, the capacity of this fraction to be enzymatically converted into glucose, or enzymatic hydrolysis degree (EH), has been measured. Non-pretreated cardoon and pretreated solid fractions were enzymatically hydrolyzed in 100 mL Erlenmeyer flasks for 72 h, using 0.05 M citrate buffer (pH 4.8) at 50 °C, an agitation speed of 150 rpm, with 10% w/w content of dry substrate. A mixture of cellulases (Celluclast 1.5 L) from *Trichoderma reesei* ATCC26924 (purchased from Sigma–Aldrich Co., Ltd, USA) and β -glucosidases or cellobioases (Novozyme 188) (purchased from Sigma–Aldrich Co., Ltd, USA) was employed as enzymatic cocktail. The nominal activities of cellulase and cellobiase were 70 FPU·g⁻¹ and 1274 IU·g⁻¹, respectively; they were added to the reacting mixture to reach final activities of 20 FPU/g for cellulase and 40 IU/g, for cellobiase, respectively. All hydrolysis runs were performed in triplicate.

During the enzymatic hydrolysis, an aliquot of 1 mL was periodically sampled and centrifuged at 1.3·10⁵ rpm (18,928 g) for 5 min to separate the hydrolysate from the solid. The supernatant was then filtered through 0.45 μ m filter and the liquid analyzed by HPLC to measure the concentrations of the monosaccharides. All analysis carried out by HPLC in an Agilent Technology 1260 equipment, employing an Aminex HPX-87H column, in an oven at 50 °C, using an aqueous mobile phase containing 5 mmol/L of H₂SO₄ at a flow rate of 0.6 mL/min and Refractive Index Detector (RID). All analysis by HPLC were made by triplicate.

The concentration of glucose was used to calculate EH according to the following equation (Rocha et al., 2013):

$$EH = \left(\frac{m_g \cdot f_h}{m_o \cdot y_i} \right) \times 100 \quad (6)$$

Where m_g is the glucose mass in the hydrolysate (g); f_h is the conversion factor from glucose to cellulose (considering the water addition in cellulose hydrolysis $f_h = 0.9$); m_o is the initial dry mass of cardoon (g) and y_i is the fraction of cellulose in the cardoon (0.333 g/g in this case).

Table 2

Experimental program. Factor (operating conditions) levels employed in each run and H factor values.

Run	Factor A: Time (min)	Factor B: Temperature (°C)	Factor C: L/S ratio (L/kg)	Factor D: Ethanol (v/v)	H Factor
R1	60	150	20	0.25	173
R2	60	170	25	0.33	958
R3	60	190	30	0.50	4590
R4	90	150	25	0.50	255
R5	90	170	30	0.25	1417
R6	90	190	20	0.33	6801
R7	120	150	30	0.33	337
R8	120	170	20	0.50	1877
R9	120	190	25	0.25	9012

2.4. Taguchi design of experiments

The Taguchi method is a statistical design of experiments (DOE) method that takes advantage of orthogonality and fractionation to reduce the number of experiments while not losing significant information (Kumar et al., 2015). In our case, the input variables of this EW pre-treatment are: time (min), temperature (°C), L/S ratio (L/kg) and ethanol content (% v/v). Each of these variables was studied at three levels or values; according to the design matrix (L₉), 9 experiments have been carried out to determine the more favorable operating conditions. The experimental program is shown in Table 2, which also includes the H factors calculated according to equation (1), as a measure of the amount of energy required for the pre-treatment in each case.

From the experimental results, the signal-to-noise ratios (S/N) can be calculated to determine the best operating conditions within the experimental interval studied (Bose et al., 2013). In this case, the S/N ratio for *larger-the-better* characterization is considered for all factors, and calculated (for each run) using the following equation:

$$S/N = -10 \log_{10} \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{Y_i^2} \quad (7)$$

Where Y_i is each signal and n is the number of repetitions of each run.

The larger S/N ratio value for a factor means a higher influence of this factor on the response (Ross and Ross, 1988; Roy, 1990). The S/N ratio is used to obtain the optimal level of each response and thus to establish the optimum condition to maximize the response. In order to determine the variables affecting the performance criterion most significantly, ANOVA was applied, fixing the probability (p -value) at 0.05. Therefore, the contribution of each factor (CF) was computed using equation (8).

$$CF (\%) = \frac{SS_f}{SS_T} \times 100 \quad (8)$$

Here, SS_f is the sum of squares of a parameter and SS_T is the total sum of squares of all of them.

Finally, the model was validated with the confirmation runs (by duplicate) around the optimum conditions to check the variation between predicted and experimental responses.

3. Experimental results and discussion

3.1. Chemical characterization of cardoon

The chemical composition of cardoon is presented in Table 1. Carbohydrates are the main component and account for 53.10% of the dry weight, distributed among cellulose (33.27%) and hemicelluloses (19.83%), being xylose the main sugar in this fraction. Like other crops, cardoon has less lignin but more extractives, compared with wood species (Shatalov and Pereira, 2011), which could suppose better accessibility of enzymes, water and chemicals to the carbohydrate matrix.

Table 3

Chemical characterization of cardoon EW pre-treated solid obtained in each run (% cardoon dry weight).

Run	SR (%)	Gln (%)	Xln (%)	Ara (%)	AG (%)	AIL (%)	ASL (%)
R1	71.33 ± 1.28	30.85 ± 0.20	13.57 ± 0.16	0.14 ± 0.14	2.20 ± 0.04	8.62 ± 0.01	2.00 ± 0.14
R2	63.00 ± 1.10	32.61 ± 0.97	6.33 ± 0.02	0.03 ± 0.00	1.30 ± 0.00	7.53 ± 0.08	2.13 ± 0.06
R3	55.85 ± 1.96	31.99 ± 0.31	4.99 ± 0.05	ND	0.76 ± 0.03	5.03 ± 0.01	0.75 ± 0.01
R4	71.51 ± 1.39	29.25 ± 0.48	12.85 ± 0.08	0.09 ± 0.00	2.32 ± 0.01	8.75 ± 0.09	2.36 ± 0.06
R5	60.00 ± 1.65	30.87 ± 1.04	4.58 ± 0.07	ND	0.77 ± 0.03	7.20 ± 0.07	0.88 ± 0.00
R6	53.20 ± 1.97	31.38 ± 0.45	2.17 ± 0.05	ND	0.39 ± 0.02	5.96 ± 0.04	0.55 ± 0.01
R7	69.00 ± 2.01	29.22 ± 0.17	9.22 ± 0.18	ND	1.81 ± 0.01	7.94 ± 0.11	1.80 ± 0.01
R8	57.50 ± 0.50	30.96 ± 0.21	8.68 ± 0.11	ND	1.10 ± 0.03	6.65 ± 0.03	0.85 ± 0.01
R9	49.76 ± 2.20	29.55 ± 0.23	2.00 ± 0.01	ND	0.29 ± 0.01	5.71 ± 0.10	0.54 ± 0.01

SR: solids recovery, Gln: glucans, Xln: xylans, Ara: arabinans, AG: acetyl groups, AIL: acid insoluble lignin, ASL: acid soluble lignin, ND: No detected.

Data of chemical characterization of our material are in the range of those reported in previous studies (Ballesteros et al., 2008; Cotana et al., 2015; Ligerio et al., 2007).

3.2. Optimization of the operating conditions in EW fractionation

Cardoon was fractionated with an EW liquor (with a 1% H₂SO₄ dry basis) following the orthogonal design of experiments proposed in Table 2. The results of the pre-treated solids in terms of solids recovery (SR) and polysaccharide and lignin composition are given in Table 3. The total SR ranged from 49.76% to 71.51%. Experiments carried out at 190 °C, the highest tested temperature, yielded the lowest SR value and the highest delignification (low AIL and ASL) and hemicelluloses hydrolysis (low Xln, Ara and AG); these results are coherent with the high severity of the pre-treatments according to the finds of other authors (Salapa et al., 2017; Wildschut et al., 2013). The SR value obtained is superior to those published in other studies when other pre-treatments as soda-anthraquinone (Antunes et al., 2000) diluted acid (Ballesteros et al., 2008) or steam explosion (Cotana et al., 2015) were used; although glucan content remaining in the solid fraction is similar to that found in the original cardoon. However, hemicelluloses and lignin are efficiently removed by the EW pre-treatment, so their respective amounts in the pre-treated solids are significantly reduced.

For the measurements of the quality of the EW pre-treatment, the three parameters defined by equations (3) to (5) have been considered: the cellulose recovery (GR), the ability to remove xylans (XH) and to remove lignin (DD). In addition, enzyme accessibility to the cellulosic fraction has been another criterion for solid quality, measured as glucose final concentration related to the theoretical maximum (EH), according to equation (6). Table 4 shows the values of these quality parameters.

The results obtained for GR indicate a high similarity between the different pretreated solids obtained under different conditions. The variation ranges, from 87.82% to 98.02%, indicate that there is a high recovery of cellulose in all cases, despite the different conditions of the pre-treatment. Therefore, it is confirmed that EW cardoon fractionation

is efficient, because more than 87% of glucans in the original material are still present in the solid fraction.

There is a large variation in the XH response, from 16.18% (R1) to 87.63% (R9) what indicates that hemicellulose undergoes major removal under the pre-treatment conditions. In addition, xylans removal occurs in parallel with delignification, because DD ranges from 38.87% (R4) to a maximum of 64.88% (R3). It is well-known that the removal of extractives, hemicelluloses and lignin further favors the enzymatic hydrolysis.

The measurement of EH values has revealed major differences associated to hemicellulose-lignin matrix removal, from a minimum of 34.30% (R4), obtained under conditions minimizing XH and DD, to a maximum of 83.10% (R6) under conditions that maximize XH and maintain high DD. This means that the capacity of the cellulosic fraction to be transformed into glucose increases approximately by 700% after the pre-treatment of the original cardoon. It is, therefore, evident that the highest XH, DD and EH are achieved in the materials pretreated with the maximum reaction temperature (190 °C). These results are consistent with those obtained by us and by other authors using diverse substrates as softwoods (Pan et al., 2005; Valenzuela et al., 2016), hybrid poplar (Pan et al., 2007) and wheat straw (Chen et al., 2015; Huijgen et al., 2011; Vergara et al., 2018), confirming that pre-treatment using EW improves the conversion of the cellulose fraction due to the combined effect of delignification and hemicelluloses hydrolysis (Vergara et al., 2018; Zhang et al., 2016a).

The effect of the input variables on the four responses measured has been determined by the S/N ratio defined by the Eq. (7). For each response (GR, XH, DD and EH), the mean of the S/N ratios (with a *larger-the-better* criteria) has been calculated at the three levels of each input variable (A: time, B: temperature, C: L/S ratio and D: ethanol concentration). Fig. 1 shows the main effect plots for each response. Thus, the strongest influence on the GR is the time of pre-treatment, followed by temperature, L/S ratio and ethanol content, as can be seen in Fig. 1a. For the other three responses (XH, DD and EH), temperature always has the strongest effect, while there are only moderate effects of time, L/S ratio and ethanol content. However, for the GR, the S/N ratio variations

Table 4

Response values achieved in different runs of the EW fractionation and their S/N ratios calculated by Eq. (2).

Run	GR (%)	S/N	XH (%)	S/N	DD (%)	S/N	EH (%)	S/N
Cardoon	-		-		-		10.42 ± 0.02	
R1	92.74 ± 0.59	39.35	16.18 ± 0.99	24.18	39.79 ± 0.08	32.00	37.38 ± 1.57	31.45
R2	98.02 ± 2.90	39.83	60.90 ± 0.11	35.69	47.45 ± 0.56	33.52	62.65 ± 0.42	35.94
R3	96.16 ± 0.93	39.66	69.16 ± 0.29	36.80	64.88 ± 0.06	36.24	67.96 ± 0.03	36.65
R4	87.92 ± 1.44	38.88	20.60 ± 0.48	26.28	38.87 ± 0.63	31.79	34.30 ± 0.00	30.71
R5	92.79 ± 3.12	39.35	71.69 ± 0.46	37.11	49.72 ± 0.51	33.93	68.76 ± 0.24	36.75
R6	94.31 ± 1.37	39.49	86.59 ± 0.32	38.75	58.39 ± 0.27	35.33	83.10 ± 0.56	38.39
R7	87.82 ± 0.52	38.87	43.08 ± 1.09	32.69	44.58 ± 0.78	32.98	47.02 ± 0.76	33.45
R8	93.06 ± 0.63	39.38	46.40 ± 0.71	33.33	53.54 ± 0.24	34.57	64.92 ± 0.20	36.25
R9	88.83 ± 0.71	38.97	87.63 ± 0.05	38.85	60.15 ± 0.68	35.59	80.25 ± 0.18	38.09

GR: glucans recovery, XH: xylans hydrolysis, DD: degree of delignification, EH: enzymatic hydrolysis, S/N: signal-to-noise ratio.

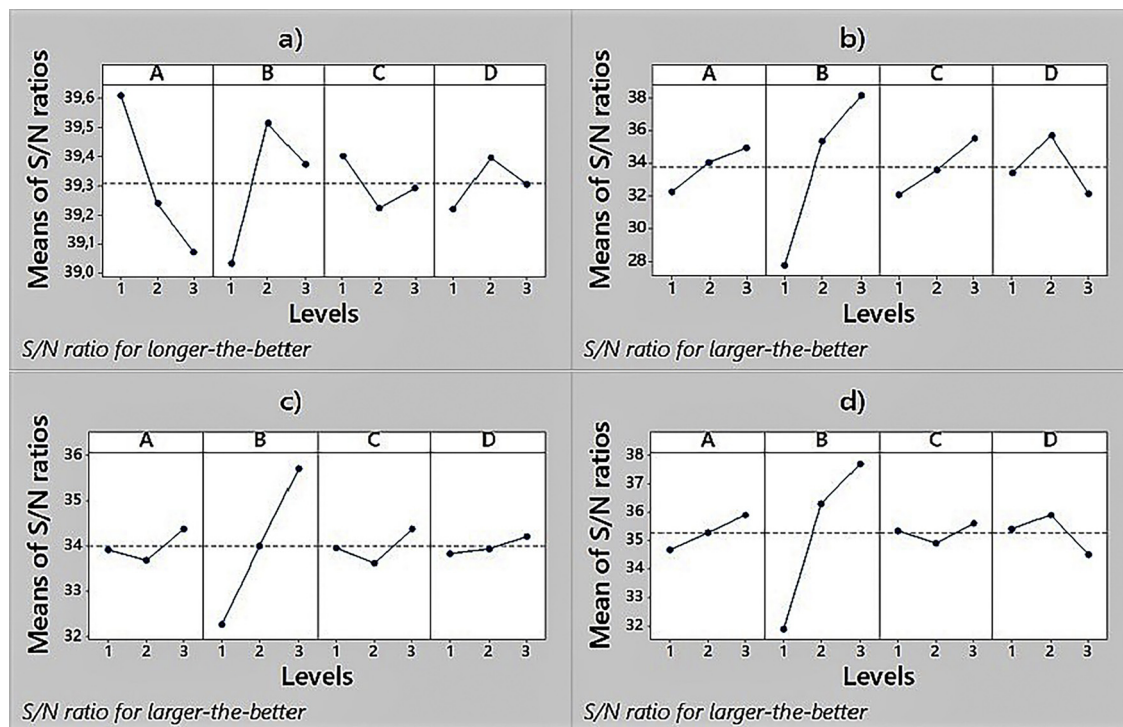


Fig. 1. Main effect plots for S/N ratios with the *larger-the-better* criteria. Responses: (a) Glucan recovery (GR, %), (b) Xylan hydrolysis (XH, %), (c) Degree of delignification (DD, %) and (d) Enzymatic hydrolysis (EH, %).

Table 5
Contribution (%) of the EW variables to the pre-treatment responses.

Factor	Contribution to each response (%)			
	GR (%)	XH (%)	DD (%)	EH (%)
A: time (min)	49.84	4.10	3.21	4.32
B: Temperature (°C)	40.12	82.59	90.93	90.35
C: L/S ratio (L/kg)	4.67	3.71	4.09	0.51
D: Ethanol conc. (L/L)	5.37	9.60	1.77	4.83
TOTAL	100	100	100	100

GR: glucans recovery, XH: xylans hydrolysis, DD: degree of delignification, EH: enzymatic hydrolysis.

Table 6
Results of the run carried out at optimal conditions ($A_1B_3C_1D_1$) of cardoon fractionation and comparison with the predicted values (Eq. (9)).

Responses	$A_1B_3C_1D_1$ Experimental	$A_1B_3C_1D_1$ Predicted
GR (%)	97.63 ± 0.67	96.35
S/N	39.79	39.69
XH (%)	68.61 ± 0.25	70.68
S/N	36.73	34.60
DD (%)	58.78 ± 0.78	59.85
S/N	35.38	35.46
EH (%)	71.83 ± 0.82	74.92
S/N	37.13	37.29

$A_1B_3C_1D_1$: 60 min, 190 °C, 20 L/Kg, 0.25 L/L

GR: glucans recovery, XH: xylans hydrolysis, DD: degree of delignification, EH: enzymatic hydrolysis, S/N: signal-to-noise ratio.

are much lower than that observed for the other three responses, which is coherent with the small variations in the recovery of glucans.

Additionally, the main effect plots determine the optimum factor levels for each response. As can be seen, $A_1B_2C_1D_2$ are the optimum conditions for GR, while the levels $A_3B_3C_3D_3$ are the optimum conditions for DD, and the optimum for XH and EH are $A_3B_3C_3D_2$.

In order to establish if the variations are statistically significant, ANOVA was carried out with a 95% of confidence level ($p \leq 0.05$); in that way, the contribution of each variable is determined for each response. The results can be seen in Table 5; only those variables with a contribution higher than 10% are considered to affect the response significantly. Thus, in the case of GR, the factors with CF > 10% are time (49.84%) and temperature (40.12%), being both statistically significant, with $p = 0.0280$ and $p = 0.0400$, respectively. Temperature is the only variable affecting XH, DD and EH, with CF = 82.59% ($p = 0.0053$), CF = 90.93% ($p = 0.0010$) and CF = 90.35% ($p = 0.0009$). The perceptual contribution of combined error is relatively small for GR, DD and EH, with 10.03%, 9.07% and 9.65% respectively, which indicates that most of the variations are explained by the Taguchi approach. However, for XH, the combined error is 17.41%, which indicates that temperature, the only variable with significant effect, leaves unexplained a significant part of the variation in this response.

Based on ANOVA results, the only variable of the EW pre-treatment for cardoon that has influence on the responses is the temperature, with the exception of GR, influenced by both temperature and pre-treatment time.

3.3. Confirmatory experiments on the optimization of the EW operating conditions

Although the Taguchi method is useful to optimize a single response variable, it is not so suitable for multiple-response optimization, because the optimum levels are deduced for each response, without considering mixed effects of variables. In this case, among all the responses, EH is considered the prevailing one because is directly related with the quality of the cellulosic material obtained with the EW fractionation and with the economic viability of the glucose production. Considering the previous ANOVA study, only temperature has effect on EH (also on DD and XH), accordingly the rest of variables can be kept at their lowest levels ($A_1B_3C_1D_1$) to minimize the energy input associated to high levels of the variables. The GR response reaches the optimum value when the levels of the factors employed are $A_1B_2C_1D_1$, although

Table 7

Summary of cardoon pre-treatment methods and operating conditions and respective glucose yields in literature.

Pre-treatment	Conditions	H factor	EH ^a	Reference
Milled and screened (40 mesh) + SE	230 °C; 1 min	3467	(2% w/v) 88%	Martinez et al., 1990
Milled (5 mm) + DSA (0.2% H ₂ SO ₄)	200 °C; 10 min	2550	(2% w/v) 80%	Ballesteros et al., 2008
Milled and screened (40–60 mesh) + DSA (1.28% H ₂ SO ₄)	138.5 °C; 51.7 min	55	(2% w/v) 76%	Shatalov and Pereira, 2011
Chips (2–3 cm) + SE	200 °C; 8 min	1565	(8% w/v) 60%	Cotana et al., 2015
	220 °C; 10 min	7362	(8% w/v) 80%	
Milled and screened (40–60 mesh) + SE + AE	235 °C; 1 min	4709	(5% w/v) 73%	Fernandes et al., 2015
Milled and screened (40–60 mesh) + DSA (1.5% H ₂ SO ₄)	140 °C; 30 min	36	(2% w/v) 80%	Shatalov et al., 2017
Chips (3 cm) + DSA (6.7% H ₂ SO ₄)	130 °C; 55 min	55	(5% w/v) 68%	Fernandes et al., 2018
This work	170 °C; 90 min	1417	(10% w/v) 69%	
	190 °C; 90 min	6801	(10% w/v) 83%	

Methods: SE: Steam Explosion; DSA: Diluted Sulfuric Acid; AE: Alkaline Extraction.

^a Column of EH: Enzymatic Hydrolysis contains (% of pulp on the enzyme solution) and the glucose yield over the theoretical maximum.

the variations of GR are low in all the range of variables.

Taguchi design estimates the value of each response at the optimum levels of the variables (A₁B₃C₁D₁) by using Eq. (9) (Nelabhotla et al., 2016; Taguchi et al., 2005):

$$\text{Mean predicted} = Y + (A_1 - Y) + (B_3 - Y) + (C_1 - Y) + (D_1 - Y) \quad (9)$$

Where *Y* is the grand average of GR, HX, DD or EH (among the 9 runs of Table 4) and A₁, B₃, C₁ and D₁ are the average responses of each variable respect to the optimum levels.

To check if the operating conditions determined by Eq. (9) are optimal for the cardoon pre-treatment, two new experiments were performed (with the variables at these optimum values) and the experimental values of the responses were compared with those predicted. As can be seen in Table 6, Taguchi's optimization methodology is able to improve the results and predict with accuracy the responses of the cardoon fractionation with very small differences of 1.31%, 2.93%, 1.79% and 4.12% for GR, HX, DD and EH, respectively. This concordance validates the method to optimize EW pre-treatment conditions of cardoon.

Finally, Table 7 compares the results obtained in this study with other previously reported by other authors for *C. cardunculus* using diverse pre-treatments methods as steam explosion, diluted acid or alkaline extraction. The comparison is made in terms of EH response and the amount of energy involved, H factor, calculated from the operational conditions employed. All these works show results achieved with pre-treatments other than to EW fractionation; it is remarkable that some of these works include other high-energy consumption operations such as milling (Miao et al., 2011; Williams et al., 2016). The results in the present work suppose that around a 68% of the cardoon cellulose is converted to glucose with a moderate energy input (Factor H c.a. 1400). The works reported in Table 7 obtain glucose yields in the range of 60% to 88%, but, in most cases, previous milling is performed, so particle size is low and the action of chemicals and enzymes is promoted.

The energy input is considerably higher in most of the previous reported works than in this work, the factor H values vary from 1565 to 7362 when steam explosion is the pre-treatment used. These values are much higher than that employed in this work (H = 1417) and the comparison with the EH obtained by Cotana et al. (2015), which use a factor H of 1565, is favorable to the EW pre-treatment (69% vs. 60%). Although there are some works employing diluted sulfuric as pre-treatment that report much lower values of factor H (from 36 to 55), in these cases, a previous milling (whose energy is not included in the calculation of the factor H) has been carried out. Only the work of Fernandes et al. (2018) has a low energy input (H factor = 55) without milling; the glucose conversion is a 68%, very similar to our result, and they employ a high concentration of sulfuric acid (6.7%), whose severity cannot be computed only with equation (1).

Therefore, EW pre-treatment has proved to be a good method to fractionate cardoon biomass and to obtain an acceptable yield in fermentable sugars (68% glucose) with moderate energy input. Moreover,

if higher glucose yields are required, EW pre-treatment has proved to be effective to obtain 80–83% of glucose by rising temperature until 190 °C, which supposes a similar yield than that obtained by other authors at higher temperatures and/or after milling the cardoon (Ballesteros et al., 2008; Cotana et al., 2015; Shatalov et al., 2017).

4. Conclusions

Cardoon, a plant adapted to low fertility soils, is a potential crop to improve the biomass supply in marginal lands. The EW pre-treatment has been used for the first time to fractionate cardoon as the initial stage of a lignocellulosic biorefinery with very good results.

The fractionation of cardoon with an EW mixture has been optimized by applying a Taguchi experimental design of experiments and ANOVA. The influence of operating conditions (time, temperature, L/S ratio and ethanol concentration) on the responses (GR, HX, DD and EH) have been determined.

The only statistically significant variable is the operating temperature. Therefore, the best operating conditions to maximize glucose production were: the lowest time (60 min), L/S ratio (20 L/kg) and ethanol concentration (0.25 L/L) values, and the highest temperature studied (190 °C). Compared to other pre-treatments, as steam explosion or diluted sulfuric acid, EW is an efficient process for cardoon valorization that could yield about 80% glucose at low to moderate energy consumption.

Acknowledgments

This study has been supported by Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) under contact CTQ2013-45970-C2-2-R, and Madrid Regional Government (Project RETO PROSOST P2013-MAE2907). The great support for Priscilla Vergara provided by CONICYT - DOCTORADO BECAS CHILE/BECAS CHILE/2015 through grant 72160108, is also gratefully recognized. We would also like to express gratitude to Dr. Maria Dolores Curt, from the School of Agricultural, Food and Biosystems Engineering (Polytechnic University of Madrid), for kindly supplying the raw material (*Cynara Cardunculus*).

References

- Abbate, V., Patané, C., 1996. Biomass crops for energy of possible introduction to Sicily. *Proceedings of the 9th European Bioenergy Conference* 622–627.
- Antunes, A., Amaral, E., Belgacem, M.N., 2000. *Cynara cardunculus* L.: chemical composition and soda-anthraquinone cooking. *Ind. Crops Prod.* 12, 85–91. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(00\)00040-6](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(00)00040-6).
- Ballesteros, I., Ballesteros, M., Manzanares, P., Negro, M.J., Oliva, J.M., Sáez, F., 2008. Dilute sulfuric acid pretreatment of cardoon for ethanol production. *Biochem. Eng. J.* 42, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.06.001>.
- Bose, P.K., Deb, M., Banerjee, R., Majumder, A., 2013. Multi objective optimization of performance parameters of a single cylinder diesel engine running with hydrogen using a Taguchi-fuzzy based approach. *Energy* 63, 375–386. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2013.10.045>.
- Chaves-López, C., Usai, D., Donadu, M.G., Serio, A., González-Mina, R.T., Simeoni, M.C.,

- Molicotti, P., Zanetti, S., Pinna, A., Paparella, A., 2018. Potential of: Borojoa patinoi Cuatrecasas water extract to inhibit nosocomial antibiotic resistant bacteria and cancer cell proliferation in vitro. *Food Funct.* 9, 2725–2734. <https://doi.org/10.1039/c7fo01542a>.
- Chen, H., Zhao, J., Hu, T., Zhao, X., Liu, D., 2015. A comparison of several organosolv pretreatments for improving the enzymatic hydrolysis of wheat straw: substrate digestibility, fermentability and structural features. *Appl. Energy* 150, 224–232. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.04.030>.
- Choi, J.-H., Jang, S.-K., Kim, J.-H., Park, S.-Y., Kim, J.-C., Jeong, H., Kim, H.-Y., Choi, I.-G., 2018. Simultaneous production of glucose, furfural, and ethanol organosolv lignin for total utilization of high recalcitrant biomass by organosolv pretreatment. *Renew. Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.05.052>.
- Cotana, F., Cavalaglio, G., Gelosia, M., Coccia, V., Petrozzi, A., Ingles, D., Pompili, E., 2015. A comparison between SHF and SSSF processes from cardoon for ethanol production. *Ind. Crops Prod.* 69, 424–432. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.064>.
- Curt, M.D., Sánchez, G., Fernández, J., 2002. The potential of *Cynara cardunculus* L. for seed oil production in a perennial cultivation system. *Biomass Bioenergy* 23, 33–46. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(02\)00030-2](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(02)00030-2).
- Fernandes, M.C., Ferro, M.D., Paulino, A.F.C., Chaves, H.T., Evtuguin, D.V., Xavier, A.M.R.B., 2018. Comparative study on hydrolysis and bioethanol production from cardoon and rockrose pretreated by dilute acid hydrolysis. *Ind. Crops Prod.* 111, 633–641. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.037>.
- Fernandes, M.C., Ferro, M.D., Paulino, A.F.C., Mendes, J.A.S., Gravitis, J., Evtuguin, D.V., Xavier, A.M.R.B., 2015. Enzymatic saccharification and bioethanol production from *Cynara cardunculus* pretreated by steam explosion. *Bioresour. Technol.* 186, 309–315. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.037>.
- Fernández, J., 1998. Cardoon. *Energy Plant Species*. James James Sci. Publ. Ltd., London, pp. 113–117.
- Fernández, J., Curt, M.D., Aguado, P.L., 2006. Industrial applications of *Cynara cardunculus* L. for energy and other uses. *Ind. Crops Prod.* 24, 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.06.010>.
- Gominho, J., Fernandez, J., Pereira, H., 2001. *Cynara cardunculus* L. - a new fibre crop for pulp and paper production. *Ind. Crops Prod.* 13, 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(00\)00044-3](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(00)00044-3).
- Hergert, H.L., Pye, E.K., 1992. TAPPI Solvent Pulping Symp. in: Proc.
- Huijgen, W.J.J., Smit, A.T., Reith, J.H., Uil, H. Den, 2011. Catalytic organosolv fractionation of willow wood and wheat straw as pretreatment for enzymatic cellulose hydrolysis. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86, 1428–1438. <https://doi.org/10.1002/jctb.2654>.
- Kumar, R.S., Sureshkumar, K., Velraj, R., 2015. Optimization of biodiesel production from *Manilkara zapota* (L.) seed oil using Taguchi method. *Fuel* 140, 90–96.
- Ligero, P., Villaverde, J.J., Vega, A., Bao, M., 2007. Acetosolv delignification of depithed cardoon (*Cynara cardunculus*) stalks. *Ind. Crops Prod.* 25, 294–300. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.12.009>.
- Martinez, J., Negro, M.J., Saez, F., Manero, J., Saez, R., Martin, C., 1990. Effect of acid steam explosion on enzymatic hydrolysis of *O. nervosum* and *C. cardunculus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 24–25, 127–134. <https://doi.org/10.1007/BF02920239>.
- Miao, Z., Grift, T.E., Hansen, A.C., Ting, K.C., 2011. Energy requirement for comminution of biomass in relation to particle physical properties. *Ind. Crops Prod.* 33, 504–513. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.12.016>.
- Nelabhotla, D.M., Jayaraman, T.V., Asghar, K., Das, D., 2016. The optimization of chemical mechanical planarization process-parameters of c-plane gallium-nitride using Taguchi method and grey relational analysis. *Mater. Des.* 104, 392–403. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2016.05.031>.
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour. Technol.* 74, 25–33. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00161-3).
- Pan, X., Arato, C., Gilkes, N., Gregg, D., Mabew, W., Pye, K., Xiao, Z., Zhang, X., Saddler, J., 2005. Biorefining of softwoods using ethanol organosolv pulping: preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products. *Biotechnol. Bioeng.* 90, 473–481. <https://doi.org/10.1002/bit.20453>.
- Pan, X., Xie, D., Kang, K.-Y., Yoon, S.-L., Saddler, J.N., 2007. Effect of organosolv ethanol pretreatment variables on physical characteristics of hybrid poplar substrates. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Springer, pp. 367–377.
- Parawira, W., Tekere, M., 2011. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 31, 20–31. <https://doi.org/10.3109/07388551003757816>.
- Perez-Cantu, L., Schreiber, A., Schütt, F., Saake, B., Kirsch, C., Smirnova, I., 2013. Comparison of pretreatment methods for rye straw in the second generation biorefinery: effect on cellulose, hemicellulose and lignin recovery. *Bioresour. Technol.* 142, 428–435. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.054>.
- Pu, Y., Hu, F., Huang, F., Davison, B.H., Ragauskas, A.J., 2013. Assessing the molecular structure basis for biomass recalcitrance during dilute acid and hydrothermal pretreatments. *Biotechnol. Biofuels* 6, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-15>.
- Ravindran, R., Jaiswal, A.K., 2016. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: challenges and opportunities. *Bioresour. Technol.* 199, 92–102. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.106>.
- Rocha, G.J.M., Silva, V.F.N., Martín, C., Gonçalves, A.R., Nascimento, V.M., Souto-Maior, A.M., 2013. Effect of xylan and lignin removal by hydrothermal pretreatment on enzymatic conversion of sugarcane bagasse cellulose for second generation ethanol production. *Sugar Tech* 15, 390–398. <https://doi.org/10.1007/s12355-013-0218-9>.
- Ross, P.J., Ross, P.J., 1988. *Taguchi Techniques for Quality Engineering: Loss Function, Orthogonal Experiments, Parameter and Tolerance Design*. McGraw-Hill, New York.
- Roy, R.K., 1990. *A Primer on Taguchi Method*. Van Nostrand Reinhold Int. Co. Ltd., New York.
- Salapa, I., Katsimpouras, C., Topakas, E., Sidiras, D., 2017. Organosolv pretreatment of wheat straw for efficient ethanol production using various solvents. *Biomass Bioenergy* 100, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.03.011>.
- Sharazi, A.M., Van Heiningen, A., 2017. Ethyl xylosides formation in SEW (AVAP®) fractionation of sugarcane straw: implications for ethanol and xylose recovery. *Holzforchung* 71, 951–959. <https://doi.org/10.1515/hf-2017-0041>.
- Shatalov, A.A., Morais, A.R.C., Duarte, L.C., Carvalho, F., 2017. Selective single-stage xylan-to-xylose hydrolysis and its effect on enzymatic digestibility of energy crops giant reed and cardoon for bioethanol production. *Ind. Crops Prod.* 95, 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.10.017>.
- Shatalov, A.A., Pereira, H., 2011. Biorefinery of energy crop cardoon (*Cynara cardunculus* L.)-hydrolytic xylose production as entry point to complex fractionation scheme. *J. Chem. Eng. Process Technol.* 2, 118–125. <https://doi.org/10.4172/2157-7048.1000118>.
- Taguchi, G., Chowdhury, S., Wu, Y., et al., 2005. *Taguchi's Quality Engineering Handbook*. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ.
- Valenzuela, R., Pribe, X., Troncoso, E., Ortega, I., Parra, C., Freer, J., 2016. Fiber modifications by organosolv catalyzed with H₂SO₄ improves the SSF of *Pinus radiata*. *Ind. Crops Prod.* 86, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.037>.
- Vergara, P., Wojtusik, M., Revilla, E., Ladero, M., García-Ochoa, F., Villar, J.C., 2018. Wheat straw fractionation by ethanol-water mixture: optimization of operating conditions and comparison with diluted sulfuric acid pre-treatment. *Bioresour. Technol.* 256, 178–186. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.137>.
- Villar, J.C., Caperos, A., García-Ochoa, F., 1997. Oxidation of hardwood kraft-lignin to phenolic derivatives. Nitrobenzene and copper oxide as oxidants. *J. Wood Chem. Technol.* 17, 259–285.
- Vroom, K.E., 1957. The “H” factor: a means of expressing cooking times and temperatures as a single variable. *PPMC* 58, 228–231.
- Wildschut, J., Smit, A.T., Reith, J.H., Huijgen, W.J.J., 2013. Ethanol-based organosolv fractionation of wheat straw for the production of lignin and enzymatically digestible cellulose. *Bioresour. Technol.* 135, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.050>.
- Williams, O., Newbolt, G., Eastwick, C., Kingman, S., Giddings, D., Lormor, S., Lester, E., 2016. Influence of mill type on densified biomass comminution. *Appl. Energy* 182, 219–231. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.08.111>.
- Wojtusik, M., Villar, J.C., Zurita, M., Ladero, M., García-Ochoa, F., 2017. Study of the enzymatic activity inhibition on the saccharification of acid pretreated corn stover. *Biomass Bioenergy* 98, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.01.010>.
- Young, R.A., 1994. Comparison of the properties of chemical cellulose pulps. *Cellulose* 1, 107–130. <https://doi.org/10.1007/BF00819662>.
- Zhang, H., Fan, M., Li, X., Zhang, A., Xie, J., 2018. Enhancing enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse by ferric chloride catalyzed organosolv pretreatment and tween 80. *Bioresour. Technol.* 258, 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.004>.
- Zhang, K., Pei, Z., Wang, D., 2016a. Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals: a review. *Bioresour. Technol.* 199, 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.102>.
- Zhang, Z., Harrison, M.D., Rackemann, D.W., Doherty, W.O.S., O'Hara, I.M., 2016b. Organosolv pretreatment of plant biomass for enhanced enzymatic saccharification. *Green Chem.* 18, 360–381.
- Zhao, X., Cheng, K., Liu, D., 2009. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 815–827. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1883-1>.
- Zhao, X., Li, S., Wu, R., Liu, D., 2017. Organosolv fractionating pre-treatment of lignocellulosic biomass for efficient enzymatic saccharification: chemistry, kinetics, and substrate structures. *Biofuels Bioprod. Biorefin.* 11, 567–590.

Autores: Priscilla Vergara, Miguel Ladero, Félix García-Ochoa, Juan C. Villar.

Título: Pre-treatment of corn stover, *Cynara Cardunculus L.* stems and wheat straw by ethanol-water and diluted sulfuric acid: comparison under different energy input conditions.

Revista: Bioresource Technology. 270 (2018) 449-456.

Índice de impacto: 6.669

Categoría: Ingeniería agrícola, biotecnología y microbiología aplicada, combustibles y energía.

Sub-categoría: Biomasa & Utilización de material prima. Conversión enzimática/tratamiento de celulosa/lignocelulosa.

Resumen: La biorrefinería lignocelulósica tiene como objetivo la producción de productos químicos y biocombustibles, mediante procesos rentables, a partir de biomasa lignocelulósica (BLC). La etapa de pre-tratamiento de la BLC es clave para cumplir este objetivo, debido a que representa el 20% del coste total. La utilización de múltiples materias primas se propone como una estrategia para reducir estos costes, al obtener beneficios económicos a mayor escala. Sin embargo, se espera que las diferentes materias primas tengan diferencias en su respuesta a los pre-tratamientos. Es por esto que se estudió el fraccionamiento mediante el pre-tratamiento con mezclas de etanol-agua (EW) y el pre-tratamiento con ácido sulfúrico diluido (DSA) en similares condiciones de gasto energético, de tres materias primas diferentes: paja de trigo (PT), tallos de *Cynara cardunculus L.* (cardo) y rastrojo de maíz (RM).

Las tres materias primas fueron pre-tratadas con EW, con 1% de H₂SO₄ (sobre biomasa) como catalizador, o alternativamente, mediante una solución de DSA con H₂SO₄ al 1%. La temperatura y el tiempo se variaron para obtener una amplia gama de insumos de energía (factor H). Los residuos sólidos y los licores obtenidos fueron analizados para determinar las composiciones en carbohidratos y lignina y de esta forma detectar los cambios en los materiales en términos de recuperación de sólidos, recuperación de glucanos, xilanos

eliminados, deslignificación y rendimiento de glucosa. En todos los casos, la cantidad de energía involucrada se ha tomado como un criterio para la sostenibilidad. Además, los sólidos se hidrolizaron enzimáticamente (72 h) con un coctel enzimático comercial (Celluclast 1.5L y Novozyme 188) para evaluar la producción de glucosa (HPLC).

En términos generales, EW es más eficiente para eliminar la lignina y DSA es más apropiado para hidrolizar los xilanos. El efecto combinado de la deslignificación y la eliminación de xilanos es responsable de la mejora en la HE de celulosa. En condiciones de insumos de energía moderada-baja, el pre-tratamiento EW produce mejores resultados que DSA, con rendimientos de glucosa en el rango del 50-60 % para el RM y los tallos de cardo; mientras que las pulpas de PT alcanzan un 80 %. Por lo tanto, la biorrefinería de materias primas múltiples necesita un estudio previo para ajustar el tipo y las condiciones del pre-tratamiento a cada materia prima.

Enlace: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852418313117>
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.058>



Pre-treatment of corn stover, *Cynara cardunculus* L. stems and wheat straw by ethanol-water and diluted sulfuric acid: Comparison under different energy input conditions

Priscilla Vergara^a, Miguel Ladero^b, Felix García-Ochoa^b, Juan C. Villar^{a,*}

^a Laboratory of Cellulose and Paper, Forest Research Center – INIA, Ctra. de La Coruña km 7.5, 28040 Madrid, Spain

^b Chemical & Materials Engineering Department, Faculty of Chemistry, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Ethanol-water pre-treatment
Diluted sulfuric acid pre-treatment
Corn stover
Cynara cardunculus L. stems
Wheat straw

ABSTRACT

Ethanol-water (EW) and diluted sulfuric acid (DSA) pre-treatment have been studied for lignocellulosic biomass (corn stover, *Cynara cardunculus* L. stems and wheat straw). Both pre-treatments have been compared taken into account: solids recovery, glucans recovery, xylans removed, delignification and glucose yield. In all cases, the amount of energy involved has been taken as a criterion for sustainability. In general terms, EW is more efficient to remove lignin and DSA more appropriate to hydrolyse xylans. The combined effect of delignification and xylans removal is responsible for the improvement in the enzymatic cellulose hydrolysis. Under conditions of moderate-low energy inputs, EW pre-treatment yields better results than DSA with glucose yields in the range of 50–60% for EW pre-treated corn stover and cardoon stems; while wheat straw pulps reach up to 80%. So, multiple raw materials biorefinery needs a previous study to fit the type and conditions of the pre-treatment to each feedstock.

1. Introduction

Lignocellulosic biomass is a promising feedstock for competing with fossil resources in the production of energy, fuels, chemicals and several materials. To promote the lignocellulose exploitation, a high availability of biomass in a concentrated area is necessary, because the cost of transportation does not permit its supply from long distances. Nearby resources may be limited and their valorization in a biorefinery would not take advantage of the scale factor to reduce costs. Thus, it is mandatory to maximize the use of lignocellulosic resources in the region to reduce costs in the biorefinery and to add value to the rural economies.

One possibility is the valorization of local agro-forestry residues in combination with crops that do not compete with the production of food. A common residue, in countries like USA or China, is the stover from the production of corn, which has been extensively studied in a scheme of second-generation biorefinery to produce chemicals or fuels (Park et al., 2017; Yuan et al., 2018; Zhao et al., 2018).

In low fertility soils, where the agro-forestry residues are scarce, some plants could be successfully adapted, such as the *Cynara cardunculus* L. (from now on designed cardoon), an annual plant fully adapted to ecosystems with water stress and large variations in temperature, and some soils in the Mediterranean region (Curt et al., 2002). The

productivity of cardoon in these marginal lands attains values in the range of 14–20 t.ha⁻¹, while the biomass maintains a low level of moisture that facilitates the transport (Fernández, 1998). Cardoon has been proposed as a raw material for different uses as bio-fuel, cellulose pulp and production of pharmacologically active compounds (Fernández et al., 2006) and has recently been proposed as raw material in lignocellulosic biorefineries (Lourenço et al., 2016; Vergara et al., 2018a).

To develop an integrate biorefinery for multiple raw materials all the lignocellulosic biomass need a pre-treatment to make the cellulose accessible (its main component) to the action of the cellulolytic enzymes in order to depolymerize them into glucose (Ravindran and Jaiswal, 2016). The main obstacle is the hemicelluloses-lignin matrix that surrounds the cellulose microfibrils and the presence of compact crystalline regions in the cellulose (Pu et al., 2013) and both factors can vary significantly among the different lignocellulosic biomass resources affecting the yield of cellulose saccharification.

The pre-treatment of lignocellulose is usually made by diluted acid hydrolysis, steam explosion or hot water extraction. These pre-treatments remove hemicelluloses and, partially, the lignin, although producing furfural and acetic and formic acids, which inhibit the enzymatic saccharification and further fermentation stage. Lignin

* Corresponding author.

E-mail address: villar@inia.es (J.C. Villar).

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.058>

Received 9 August 2018; Received in revised form 10 September 2018; Accepted 11 September 2018

Available online 13 September 2018

0960-8524/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

condensation can also occur (Villar et al., 1997) and the condensed lignin acts as cellulase enzymes inhibitor (Wojtusik et al., 2017) increasing the cost of glucose production. Steam explosion and hot water extraction have the advantage of not using any chemicals to hydrolyze lignocellulose; both pre-treatments take advantage of the acetyl groups bounds to the hemicelluloses, which are hydrolyzed (above 110–120 °C) to form acetic acid that contributes to the hemicelluloses hydrolysis (Taherzadeh and Karimi, 2007). Acid hydrolysis is the most used pre-treatment method, with two alternatives: diluted or concentrated acid. Concentrated acid hydrolysis could be performed at moderate temperatures, which saves energy and operational costs because non-pressure installations are necessary; the counterpart is the formation of furfural from pentoses and that a part of the acid remains at the end of the process making necessary the neutralization with an alkali, i.e. ammonia. DSA is the most used pre-treatment at an industrial scale. It is simple and economic, although it also has the problem of the lignin inhibition in the further carbohydrate enzymatic hydrolysis.

The pre-treatment of lignocellulose with a water-soluble organic solvent has been studied to produce cellulose pulps, which compete with the predominant Kraft pulping method. This alternative, named Organosolv method, was implemented at pilot plant scale (ASAM and ALCELL technologies) although without success in replacing the Kraft process (Young, 1994). By choosing a proper solvent and moderate temperature, the water-solvent cooking liquor causes selective dissolution of hemicelluloses and lignin and leaves a cellulose-rich solid easy to hydrolyse (Vergara et al., 2018b). Further solvent recovery precipitates water-insoluble lignin that can be valorised. Hemicelluloses-derived sugars and oligomers remain in the aqueous solution and could also be transformed into building blocks or platform chemicals (Bozell and Petersen, 2010).

Many water-soluble solvents as acids, peracids, ethers, ketones or alcohols have been mixed with water and tested for biomass delignification (Zhao et al., 2009). Among these, methanol and ethanol have been extensively employed because their low price and low boiling point makes their recuperation easier, although the toxicity of methanol makes the ethanol a preferable option. In this treatment, the breaking of the lignin-carbohydrate bonds causes delignification and hemicellulose removal. Moreover, the acetyl groups linked to the hemicellulose are liberated and the resulting acetic acid increases the hemicellulose hydrolysis (Zhao et al., 2009). This effect could be promoted by adding acid, usually sulfuric or hydrochloric acid, at very low concentrations, which acts as catalyst of the hemicelluloses hydrolysis (Hergert and Pye, 1992; Vergara et al., 2018b). An undesirable reaction of the EW pre-treatment is the reaction of xylose (also of other C5 and C6 sugars) with the ethanol. Xylose is produced by the hemicellulose hydrolysis and its reaction with ethanol produces ethyl-xylosides to a concentration of 1–2% of the initial ethanol (Sharazi and Van Heiningen, 2017). Therefore, this loss must be minimized to avoid excessive solvent losses and to maintain the economic sustainability of EW pre-treatment.

The EW treatment has the advantage that the production of sugars and lignin can be optimized in terms of high quality of the fractions and energy consumption within a second generation biorefinery scheme (Chen et al., 2015; Wildschut et al., 2013). Among the parameters affecting the quality of the fractions if this pre-treatment is employed, time of reaction, temperature, liquid-solid ratio and percentage of ethanol are the most remarkable, although in previous works, the temperature of the pre-treatment has been identified as the main factor with effect on the quality of the cellulose fraction (Vergara et al., 2018b, a). To maintain the energy input as low as possible, time of pre-treatment must be considered together with the temperature.

DSA treatment can be chosen as representative of the most employed treatments for the comparison with the EW treatment because it is a simple and economic process effective in the isolation of a cellulose-rich solid, presently the more commonly employed in industry.

The aim of this work is the study of the EW fractionation of three lignocellulosic materials: corn stover, cardoon stems, and wheat straw.

In the case of wheat straw, the results have been in part given in a previous work (Vergara et al., 2018b) and have been included in this study for comparison purposes. Comparison between materials and between pre-treatments will be made in terms of cellulose yield and cellulose-glucose saccharification, with special interest in the conditions of moderate or low energy input. Due to the need to increase the raw materials availability for the production of sugars and lignin within an integrated biorefinery scheme, three lignocellulosic biomasses are going to be considered, corn stover, cardoon stems and wheat straw (results in part previously reported).

2. Materials and methods

2.1. Raw materials

The raw materials used for this study were corn stover, cardoon stems and wheat straw. The corn stover and the cardoon were provided by the School of Agricultural, Food and Biosystems Engineering (Universidad Politécnica de Madrid) obtained from an experimental plantation (AIR Program of the European Union). While the wheat straw was obtained from the region of Castilla-La Mancha, Spain. Chemical composition of all materials is shown in Table 1. The moisture content of the materials was determined in oven at 110 °C for 24 h. The three raw materials used were air dried, homogenized and stored in plastic bags at 4 °C until use.

2.2. EW and DSA pre-treatment procedures

Materials were fractionated under several conditions using an EW liquor and adding 1% w/w (on dry biomass) of sulfuric acid (Sigma-Aldrich Co., Ltd, USA) as catalyst, or alternatively, with DSA pre-treatment and 1% w/w (on dry biomass) of aqueous sulfuric acid solution. The experiments were carried out in a 6 L stainless steel reactor provided with liquor recirculation, temperature control and liquor sampling. The reactor was loaded with 100 g of biomass (dry basis) and the corresponding volume of EW or DSA liquor. The liquor–solid ratio was established at 20 L/kg, and, for the EW pre-treatments, the percentage of ethanol (Panreac, Spain) was fixed at 30% (v/v). Temperature and time at maximum temperature were varied to cover a broad range of energy inputs.

Table 2 shows the runs carried out for both materials. As the energy involved in the pre-treatment depends on the temperature and time, the H-factor values have been calculated to integrate both variables into a unique parameter. This parameter is traditionally employed in the pulp industry to measure the energy uptake in the cooking stage and is calculated by the Eq. (1) (Vroom, 1957) where T is the pre-treatment temperature (K) and t is the time (h) at this temperature.

$$H = \int_0^t e^{\left(43.2 - \frac{16115}{T}\right)} dt \quad (1)$$

Table 1

Chemical composition of corn stover, cardoon stems and wheat straw (dry weight basis).

Compounds (% w/w)	Corn stover	Cardoon stems	Wheat straw
Polysaccharides	51.9	53.2	65.1
Glucan (Gln)	31.5	33.3	32.8
Xylan (Xln)	15.4	16.2	26.3
Arabinan (Ara)	2.6	0.5	3.6
Acetyl groups (AG)	2.4	3.2	2.4
Lignin (Klason)	14.1	17.6	13.8
Acid insoluble lignin (AIL)	11.5	14.3	13.1
Acid soluble lignin (ASL)	2.6	3.3	0.7
Extractives	25.9	21.5	17.0
Ash	7.9	7.5	4.1

Table 2
Conditions of the runs carried out for both EW and DSA pre-treatments.

Run	Temperature (°C)	Time (min)	H Factor	Run
EW1	130	60	26	DSA1
EW2	150	45	132	DSA2
EW3	150	60	173	DSA3
EW4	160	45	316	DSA4
EW5	170	60	958	DSA5
EW6	170	90	1417	DSA6

At the end of the run, the pre-treated material was vacuum filtered and the solid fraction was extensively washed with distilled water, and then was homogenized for 5 min in a laboratory disintegrator (Disintegrator MK IIIC, Messmer Instruments Limited, UK). The residual liquor was stored for further analysis. The solids recovery (SR) was determined gravimetrically after oven drying for 24 h at 105 °C, being calculated according to the following equation:

$$SR(\%) = \left(\frac{W_p}{W_o} \cdot 100 \right) \quad (2)$$

Where W_p is the dry weight of pre-treated material (g) and W_o is the dry weight of the original material (g) fixed at 100 g.

The composition of the solid fractions: structural carbohydrates, lignin, acetic acid, ash and extractives was analyzed in accordance with the procedures formulated by the National Renewable Energy Laboratory (NREL, Golden, CO), following the “Analytical Methods for Biomass” (Sluiter et al., 2008, 2006).

The concentrations of glucose, xylose and acid insoluble lignin were used for calculating glucan, xylan and lignin contents in the pre-treated materials. These concentrations were further employed to calculate the effect of the pre-treatment conditions on the recovery of glucans (GR), the xylans removal (XR) and the degree of delignification (DD), as given by Eqs. (3) to (5), respectively.

$$GR(\%) = \left(\frac{W_{Gp}}{W_{Go}} \cdot 100 \right) \quad (3)$$

$$XR(\%) = \left(1 - \frac{W_{Xp}}{W_{Xo}} \right) \cdot 100 \quad (4)$$

$$DD(\%) = \left(1 - \frac{W_{Lp}}{W_{Lo}} \right) \cdot 100 \quad (5)$$

Where W_{Gp} , W_{Xp} , and W_{Lp} are the glucan, xylan and lignin weight in the pre-treated material (dry basis) and W_{Go} , W_{Xo} , and W_{Lo} are those values in the initial, no pre-treated, raw material.

The composition of the liquid fractions of the pre-treatments was analyzed by HPLC (Sluiter et al., 2006). An aliquot (1 mL) of each sample was filtered through a 0.45 µm membrane before the analysis, which were carried out in an Agilent Technology 1260 equipment (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) employing an Aminex HPX-87H column (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), that was maintained at 50 °C, using an aqueous mobile phase containing 5 mmol/L of H₂SO₄-HPLC grade (Sigma–Aldrich Co., Ltd, USA) at a flow rate of 0.6 mL/min, employing a Refractive Index Detector (RID) (G1362A 1260 RID Agilent Technologies; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Following this method, monosaccharides, acetic acid, furfural and hydroxyl-methyl-furfural (HMF) (HPLC grade; Sigma–Aldrich Co., Ltd, USA) concentrations were determined according to previous calibrates.

2.3. Glucose yield (GY)

The quality of the cellulosic solids obtained after the pre-treatments has been measured as their capacity to be enzymatically converted into glucose, or glucose yield (GY). The original materials and the pre-

treated solid fractions were enzymatically hydrolyzed in 100 mL Erlenmeyer flasks, using 0.05 M citrate buffer (pH 4.8) at a temperature of 50 °C; flasks were shaken at 150 rpm for 72 h, with substrate consistency of 10% (w/v, dry basis). Cellulase (Celluclast 1.5 L) from *Trichoderma reesei* ATCC26924 (Sigma–Aldrich Co., Ltd, USA) supplemented with cellobiase (Novozyme 188) (Sigma–Aldrich Co., Ltd, USA) was employed as enzymatic cocktail. The labeled activities of cellulase and cellobiase were 70 FPU·g^{−1} and 1274 IU·g^{−1}, respectively. Cellulase and cellobiase were loaded as 20 FPU/g and 40 IU/g, respectively. All hydrolysis runs and analysis were performed by duplicate.

During the enzymatic hydrolysis, an aliquot of 1 mL hydrolysate was periodically sampled and centrifuged at 1.3·10⁵ rpm (18,928 g) for 5 min to separate the hydrolysate from the solid. The supernatant was filtered through a 0.45 µm filter and the liquid analyzed by HPLC to measure the concentration of sugars. HPLC analyses were carried out in the conditions previously described for the liquid samples. The concentration of glucose was used to calculate GY according to the following equation (Rocha et al., 2013).

$$GY = \left(\frac{m_g \cdot f_h}{m_o \cdot y_i} \right) \cdot 100 \quad (6)$$

Where m_g is the glucose mass in the hydrolysate (g); f_h is the conversion factor from glucose to cellulose (considering the water addition in cellulose hydrolysis $f_h = 0.9$); m_o is the initial dry mass of the material (g) and y_i is the fraction of cellulose in the material (0.333 g/g for cardoon stems and 0.315 g/g for corn stover).

3. Results and discussion

3.1. Chemical characterization of the raw materials

The results of the chemical characterization of corn stover, cardoon stems and wheat straw are presented in Table 1. Carbohydrates are the main group of components and account for 51.9%, 53.2% and 65.1% (w/w) of the dry weight, respectively. In all the materials considered, cellulose is about one third of the weight and hemicellulose components amount ca. 20% for corn stover and cardoon stems and 32% for wheat straw, being xylose the main sugar present. Like other herbaceous plants, these materials have small lignin content, being cardoon stems the more lignified, having more extractives than wood species, which theoretically means better access of enzymes and chemicals to the carbohydrates. Data of chemical characterization of the materials are in the range of those reported in previous studies (Ballesteros et al., 2008; Cotana et al., 2015; Weiss et al., 2010; Yuan et al., 2018).

The operational conditions, to compare the response of the materials when the EW and DSA pre-treatments are used, have been chosen to cover a wide range of energy inputs. In the experimental program performed, the H factor values cover the interval from 26 to 1417 (see Table 2). In the case of wheat straw, these runs were also part of a previous work (Vergara et al., 2018b), part of the data have been included in this study for comparison purpose. The range of temperature has been chosen to study conditions of low energy input which, in the case of temperature, would also avoid the high pressures derived from the use of ethanol in the EW pre-treatment.

3.2. Solid recovery (SR) results

The results of SR obtained with all the lignocellulosic materials under different energy inputs are shown in Fig. 1. As expected, in all the cases, the pulp yield decreases as the energy input increases due to more intense removal of the non-cellulosic components. The most relevant fact is that differences in solid recovery are high among the materials. For the higher energy inputs, corn stover only retains about a 40–45% of the biomass, independently of whether EW or DSA pre-

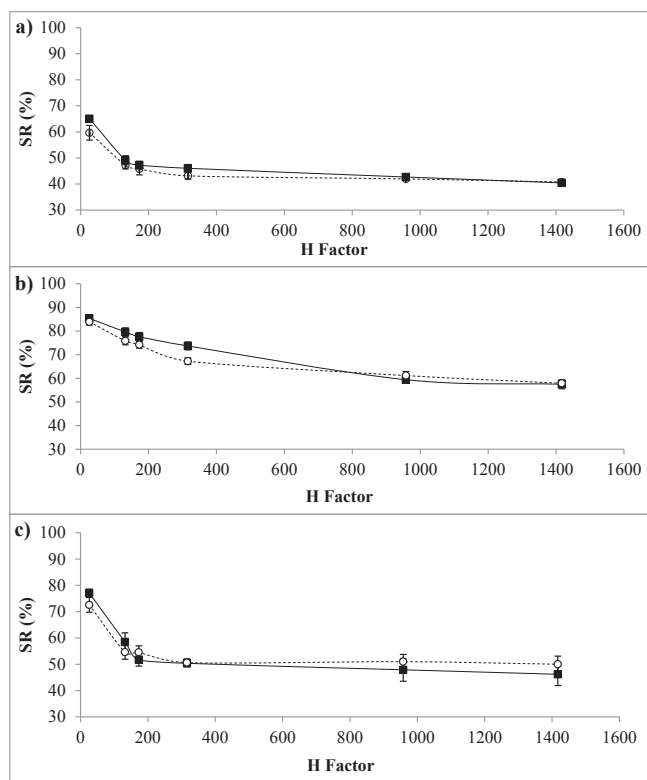


Fig. 1. SR (%) as function of H factor by EW (—■—) and DSA (---○---) pre-treatments. **a)** corn stover, **b)** cardoon stems and **c)** wheat straw.

treatments are used; under similar conditions, wheat straw yields 45–50% of the initial material; while the pre-treatment of cardoon stems maintain between 55 and 60% of the initial cardoon. The type of pre-treatment does not cause significant differences in this response, DSA and EW yield similar SR values throughout the range of H Factor values investigated.

3.3. Glucan recovery (GR) results

Although both pre-treatments yield similar amounts of solids, they generate fractions with different characteristics. Fig. 2 shows the recovery of glucans in the solid fraction and the variation with the energy input for both pre-treatments and the three materials. The GR is similar for DSA and EW methods and, as expected, most of the cellulose is retained in the solid fraction with minor variations when the energy input increases.

The main differences are found among the raw materials; thus, cardoon showed the best behavior and retains between 92 and 97% of the glucans in the solid fraction; wheat straw yields a GR slightly inferior, with values in the range of 88–93%; while corn stover only retain between 56 and 63% of the glucans; these values are clearly lower than those previously cited, which affects the versatility of this material to be transformed into glucose.

3.4. Xylan removed (XR) results

The fraction of hemicelluloses showed high reactivity to the pre-treatments (see Fig. 3) and most of the xylans were removed from the lignocellulosic materials being dissolved in the liquors. There are differences between the effectiveness of the pre-treatments, being the DSA more efficient than EW to remove xylans. For both pre-treatment methods, XR values increase as the energy input does.

Significant differences were found among the materials, up to 78% of xylans were removed from corn stover with the DSA pre-treatment

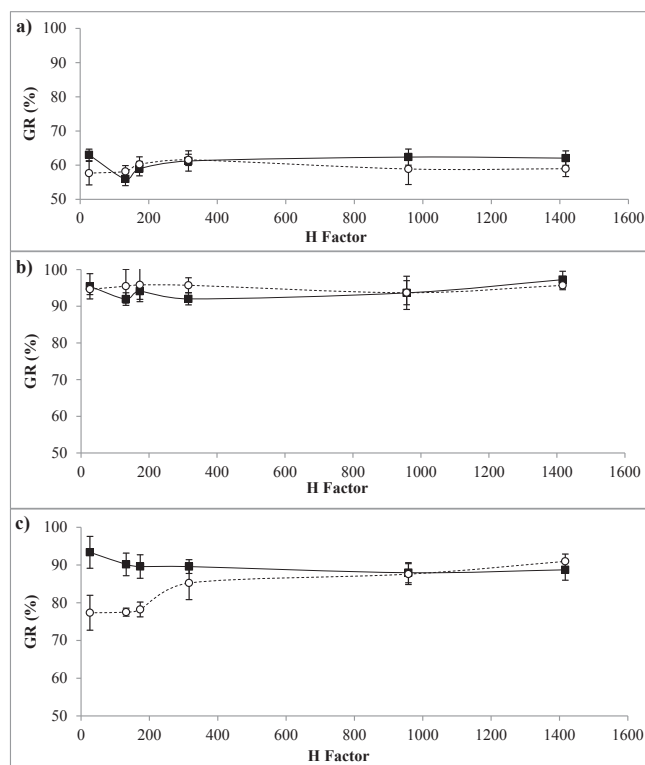


Fig. 2. GR (%) as function of H factor by EW (—■—) and DSA (---○---) pre-treatments. **a)** corn stover, **b)** cardoon stems and **c)** wheat straw.

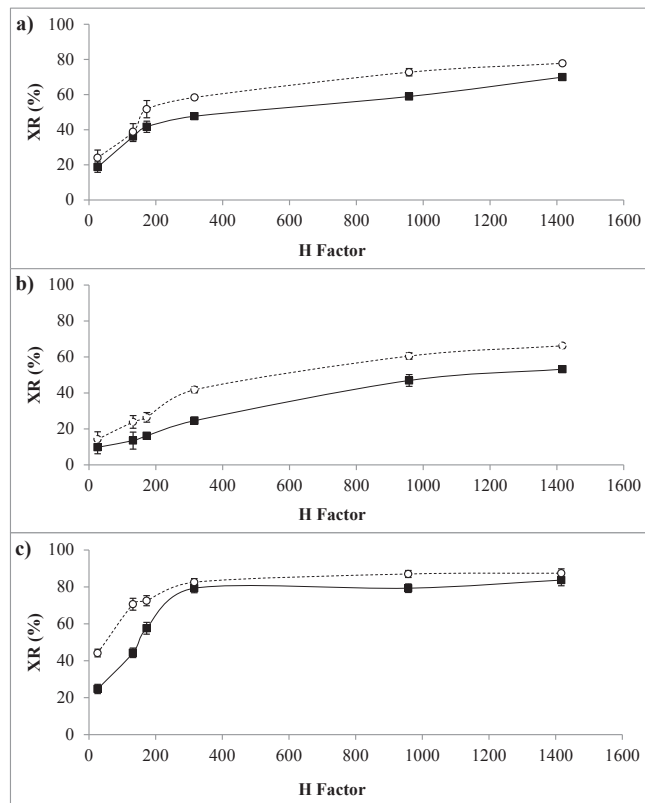


Fig. 3. XR (%) as function of H factor by EW (—■—) and DSA (---○---) pre-treatments. **a)** corn stover, **b)** cardoon stems and **c)** wheat straw.

(70% with EW), less than 87% of XR obtained from wheat straw and DSA (84% with EW), which has been the material easier to fractionate. By contrast, in the case of cardoon stems, only 66% of xylans were dissolved under the more intense conditions of the DSA pre-treatment and only 53% if EW is used, which suggests a more difficult accessibility for this material.

Acid hydrolysis of amorphous hemicelluloses is a well-known fact; in this work, both pre-treatments employed incorporate 1% (w/w) of sulfuric acid in addition to the acetic acid generated by the auto-hydrolysis of acetyl groups bound to hemicelluloses. Therefore, the differences in xylans removal between DSA and EW must be caused by a better solubility of the xylans in aqueous acid medium than in the mixture ethanol-water (Camesasca et al., 2015; Ji et al., 2017; Neureiter et al., 2002). The hydrolysis of xylans releases monomeric sugars from the solid material into the liquid fraction, increasing porosity and improving enzymatic digestibility (McMillan, 1994). DSA was also more efficient than the EW method in the removal of arabinans and glucuronic acids (data not shown), although their percentages in the solids are not significant.

The higher retention of xylans by the EW pre-treatment in comparison with the DSA (both with similar glucans recovery) has not been translated into a higher solids recovery in the EW process. This fact could be supported if the EW treatment caused a higher delignification in the cardoon than DSA pre-treatment.

3.5. Delignification degree (DD) results

Fig. 4 shows the delignification degree as a function of the energy input for both pre-treatments, EW and DSA, and for the three raw materials. It is evident that EW is the most efficient pre-treatment to remove lignin with a continuous increase of delignification degree as the energy input increases. The reason for the better performance of EW

must be the affinity of the hydrophobic lignin fragments with this media, in contrast with the hydrophilic sulfuric acid solution. The capacity of a solvent to dissolve the lignin increases as their solubility parameters (δ , Hildebrand parameter) (Hildebrand and Scott, 1962) approach a value of around $11 \text{ (J/cm}^3)^{-1/2}$, which is the solubility parameter value of lignin. This fact is supported taking into account that the acid medium itself is not a favorable solvent to promote delignification, while the addition of an organic solvent to the liquor, which has both hydrogen-donor-acceptor characters, increases the affinity for lignin (Quesada-Medina et al., 2010; Schuerch, 1952).

Another remarkable fact is the differences on this response found among the different materials studied. Corn stover and cardoon stems showed a similar behavior, with a maximum of DD around 50% under the more intense conditions of EW (H Factor 1417). In contrast, DSA conditions only remove between 8% and 20% of the lignin, with a maximum of DD around 16% for corn stover and 20% for cardoon stems, obtained at moderate-low H factors. This behaviour suggests that, under the conditions of DSA pre-treatment, part of the dissolved lignin is re-precipitated on the fibres surface and this phenomenon is more intense at the more severe pre-treatment conditions, as also found by other authors (Gütsch et al., 2012). The lignin re-precipitation has also been reported for the organosolv fractionation (Lai et al., 2014), although the nature of the EW medium, with more affinity to the lignans than DSA, would palliate the lignin re-precipitation. Wheat straw showed a better response to both pre-treatments; at low energy inputs, EW yields a well-delignified solid (DD in the range of 60–66%), while DSA yielded a DD value lower (around 30–35%).

3.6. Glucose yield (GY) results

In order to compare the quality of the solids obtained by both types of pre-treatments, the conversion of cellulose into glucose by enzymatic hydrolysis was determined. Hydrolysis tests were carried out for 72 h, with the pre-treated solids from the two pre-treatment methods (EW and DSA) and for the three materials studied, according to the method described in a previous section.

The untreated biomass is compact and difficult to digest using cellulases, but the elimination of hemicelluloses and lignin causes changes in the structure and cellulose becomes more accessible and open to swelling upon contact with cellulases (Mansfield et al., 1999). Yan et al. (2015) have reported that lignin contents in the range of 10–15% are still an obstacle for the penetration of cellulolytic enzymes into the cell wall. Moreover, lignin is not only a physical barrier able to avoid the access of enzymes to cellulose but could also be an inhibitor that adsorbs enzymes (Pan et al., 2005; Wojtusik et al., 2017) which could explain the differences in glucose yield between both pre-treatments.

Fig. 5 presents the conversion to glucose reached after 72 h with solids treated by both methods, DSA and EW; pulps made with different severity show a clear relationship between the energy involved in the pre-treatment and the increase in the percentage of glucose obtained, which is coherent with the expected effect of a higher delignification and xylans removal.

There are differences in the behavior of the materials, the pulps obtained with corn stover respond better to the EW pre-treatment, yielding up to 78% of cellulose conversion vs. 71% obtained with the solid treated by DSA, which is coherent with the big differences in delignification of the corresponding pulps; 48% vs. 8%, respectively.

Cardoon pulps showed the worst response, with only 58% of cellulose conversion at the more severe EW conditions (Factor H 1417); the pre-treatment with DSA offers similar results and only minor differences at high-energy inputs, where EW seems more effective. For this material, the difference in delignification is favorable to the EW pre-treatment, but this fact does not cause a substantial increase in cellulose conversion; other factors, such as cellulose crystallinity or the moderate xylans removal could be responsible for the low enzymatic hydrolysis efficiency.

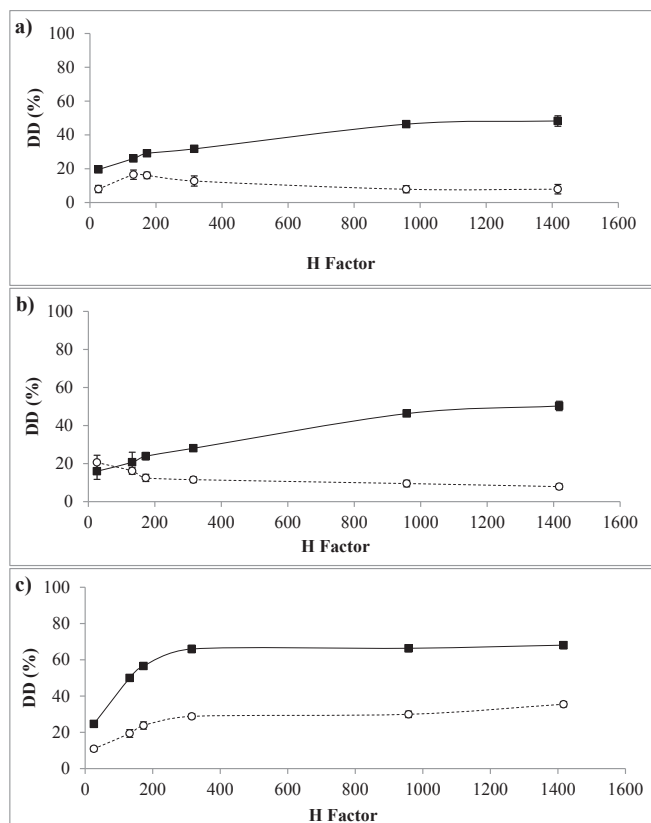


Fig. 4. DD (%) as function of H factor by EW (—■—) and DSA (—○—) pre-treatments. a) corn stover, b) cardoon stems and c) wheat straw.

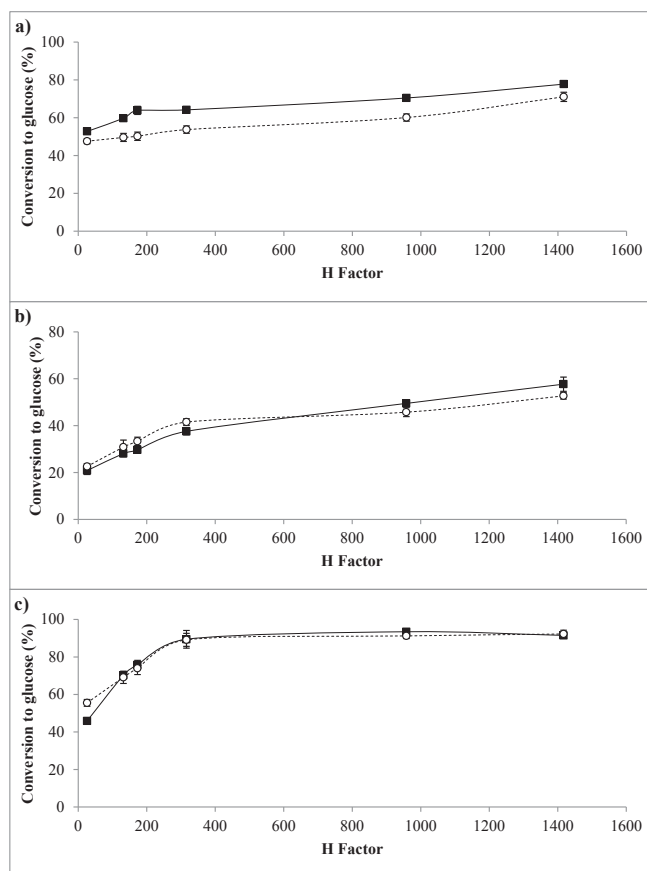


Fig. 5. Conversion to glucose (%) on glucans in pulps) as function of H factor by EW (—■—) and DSA (---○---) pre-treatments. **a)** corn stover, **b)** cardoon stems and **c)** wheat straw.

The pulps obtained from wheat straw have the better quality and the cellulose is easily converted into glucose, even at moderate energy conditions, as H factor 316; a conversion of 89% of the cellulose is obtained under these conditions. There are no significant differences between DSA and EW treatments and both methods produce good delignified pulps, with low xylans content, which would explain the easy transformation into glucose.

From an economical perspective the main product of the lignocellulosic biomass is the glucose obtained from cellulose. Accordingly, the glucose production has been again calculated for all the cases, but now with respect to the untreated biomass. These results are represented in Fig. 6. As expected, a higher GY is obtained for the more severe conditions and the EW pre-treatment gives better yields than those of DSA pre-treatment. The poor saccharification of the pulps obtained from corn stover only permits to obtain 53% of GY at the higher energy input of the EW pre-treatment, which has been proved to be also the most efficient treatment. The GY with DSA pulps is clearly inferior and only attains 42% of the theoretical maximum under the same operational conditions. Results with cardoon stems are only a bit better with 56% of GY from the EW pulps (H Factor 1417), while under the same conditions with DSA, a GY of 50% is reached. For this material, the effectiveness of both pre-treatments is similar.

Wheat straw has been the material more easily transformable into sugars, the GY could reach 80% with pulps of both pre-treatments, but the difference is that EW is more efficient at moderate-low energy inputs (Vergara et al., 2018b) which improves the sustainability of the transformation. For instance, at H factor of 316, the EW pulps yield almost the same glucose (80.13%) than at H Factor of 1417 (81.19%); while the DSA pulps at H Factor of 316, only gives a GY of 64.10%. The contrasting result of the wheat straw in comparison with the other two

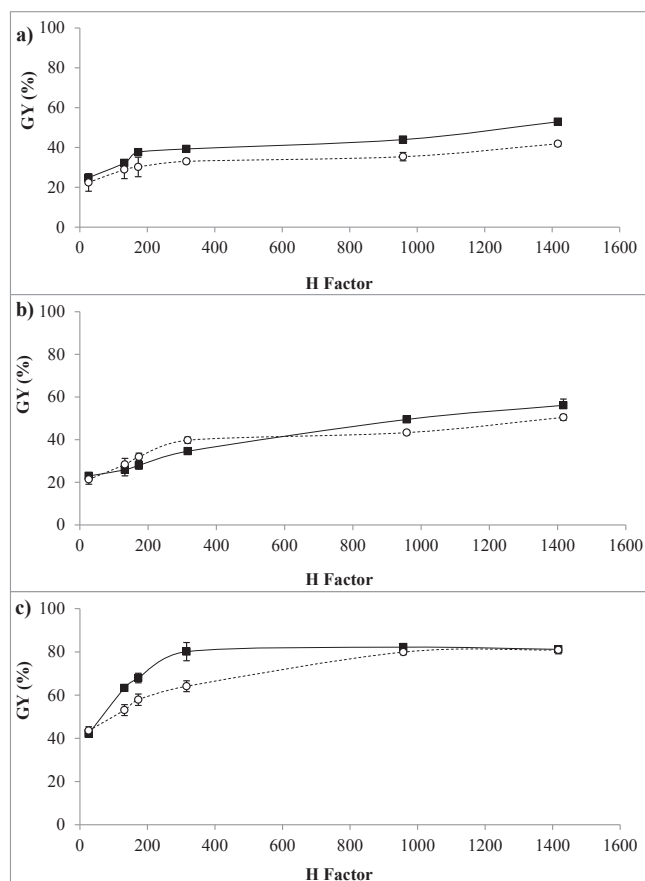


Fig. 6. GY (%) on glucans in raw materials) as function of H factor by EW (—■—) and DSA (---○---) pre-treatments. **a)** corn stover, **b)** cardoon stems and **c)** wheat straw.

materials can be explained taking into account the higher delignification and xylans removal reached in this case.

Taking into account that the main objective of this work is to compare the responses of different lignocellulosic materials under several conditions (given by the H factor) achieved by two different pre-treatments, EW and DSA, we wish to focus the results under moderate-low energy inputs in order to make the process more sustainable and economic. Accordingly, it is important to notice that although corn stover and cardoon stems yield considerable less glucose than the wheat straw, the GY could be significantly increased under more severe conditions. Thus, in a previous work (Vergara et al., 2018a) the EW pre-treatment of cardoon stems produced pulps with a GY in the range of 68–83%, although at higher H Factor values, between 1417 and 6801; the results under these conditions are comparable to the values obtained with wheat straw.

In the case of corn stover, there are few works made using the EW pre-treatment. Using a similar process, (Park et al., 2017) obtained pulps from corn stover, easy to hydrolyze into glucose. The yield was 92% on the cellulose content of the pulp, but the pre-treatment conditions were energy-intensive (190 °C during 120 min) with a previous milling which entails additional energy input. In the same work, pre-treatments made at 170 °C and times in the range of 60–120 min reached glucose yields in the range of 60–80% on the cellulose in the pulp, which is coherent with the maximum glucose yield obtained in our work (71% based on the cellulose contained in the pulp). Thus, the use of multiple raw materials in a lignocellulose biorefinery to maximize the use of the local resources needs a previous research on the individual treatment conditions of each type of biomass.

At the best of our knowledge, this study is the first that,

simultaneously, compares the fractionation of several lignocellulosic raw materials, by two pre-treatments that cover a broad range of energy inputs, and looking for the best energetic performance. The most outstanding finding is that, under the approach of a multi-feedstock biorefinery, each raw material must have pre-treatment conditions appropriate to their characteristics to obtain the maximum benefit (higher GY with our criteria). By comparing EW and DSA pre-treatments, the hydro-alcoholic EW media is always more efficient to remove lignin while the DSA media is superior to hydrolyze xylans. This behavior is observed for the three materials and explained by the different affinity of lignin and sugars towards the solvents. Both mechanisms improve the cellulose enzymatic hydrolysis and, the global result is that EW pre-treatment gives higher GY in all the wide interval of energy inputs studied, although, in the case of cardoon stems, both pre-treatments give similar GY.

Under the perspective of a multiple-feedstock biorefinery (with sugars as the main product) wheat straw is an excellent raw material easy to transform into glucose with a previous EW stage and moderate-low energy consumption. High glucose yields are also possible by using cardoon stems (Vergara et al., 2018a) or corn stover (Park et al., 2017) but the requirement of energy in the pre-treatments are clearly superior and out of the range of this study (focused in low-medium energy inputs).

4. Conclusions

Corn stover, wheat straw and cardoon have showed different behaviors under the EW and DSA pre-treatments. EW can be used with the three raw materials yielding a cellulose-rich solid. Under conditions of low-medium energy consumption, the wheat straw has showed more potential to be converted into glucose than the other two materials. EW is more favorable than DSA, especially at low energy input conditions. High delignification and hemicelluloses removal are requisites to obtain a cellulose-rich solid easy to transform into glucose. Cardoon stems and corn stover could also yield high glucose percentages but require more severe pre-treatments than wheat straw.

Acknowledgements

This work has been supported by Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (CTQ 2013-45970-C2-2-R), Madrid Regional Government (Project Reto Proso P2013-MAE-2907). Also financial support of Priscilla Vergara is gratefully recognized (CONICYT-Doctorado Becas Chile/2015- 72160108).

References

- Ballesteros, I., Ballesteros, M., Manzanares, P., Negro, M.J., Oliva, J.M., Sáez, F., 2008. Dilute sulfuric acid pretreatment of cardoon for ethanol production. *Biochem. Eng. J.* 42, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.06.001>.
- Bozell, J.J., Petersen, G.R., 2010. Technology development for the production of bio-based products from biorefinery carbohydrates – The US Department of Energy's "top 10" revisited. *Green Chem.* 12, 539–554. <https://doi.org/10.1039/b922014c>.
- Camesasca, L., Ramírez, M.B., Guigou, M., Ferrari, M.D., Lareo, C., 2015. Evaluation of dilute acid and alkaline pretreatments, enzymatic hydrolysis and fermentation of napiergrass for fuel ethanol production. *Biomass Bioenergy* 74, 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.01.017>.
- Chen, H., Zhao, J., Hu, T., Zhao, X., Liu, D., 2015. A comparison of several organosolv pretreatments for improving the enzymatic hydrolysis of wheat straw: substrate digestibility, fermentability and structural features. *Appl. Energy* 150, 224–232. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.04.030>.
- Cotana, F., Cavalaglio, G., Gelosia, M., Coccia, V., Petrozzi, A., Ingles, D., Pompili, E., 2015. A comparison between SHF and SSSF processes from cardoon for ethanol production. *Ind. Crops Prod.* 69, 424–432. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.064>.
- Curt, M.D., Sánchez, G., Fernández, J., 2002. The potential of *Cynara cardunculus* L. for seed oil production in a perennial cultivation system. *Biomass and Bioenergy* 23, 33–46. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(02\)00030-2](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(02)00030-2).
- Fernández, J., 1998. Cardoon. *Energy Plant Species. James Sci. Publ., London* 113–117.
- Fernández, J., Curt, M.D., Aguado, P.L., 2006. Industrial applications of *Cynara cardunculus* L. for energy and other uses. *Ind. Crops Prod.* 24, 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.06.010>.

- Gütsch, J.S., Nousiainen, T., Sixta, H., 2012. Comparative evaluation of autohydrolysis and acid-catalyzed hydrolysis of Eucalyptus globulus wood. *Bioresour. Technol.* 109, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.018>.
- Hergert, H.L., Pye, E.K., 1992. TAPPI Solvent Pulping Symp. in: Proc. Hildebrand, J.H., Scott, R.L., 1962. Solubility of Nonelectrolytes (Reinhold, New York, ed. 3, 1950); Regular Solutions.
- Ji, X., Ma, H., Tian, Z., Lyu, G., Fang, G., Chen, J., Saeed, H.A.M., 2017. Production of xylose from diluted sulfuric acid hydrolysis of wheat straw. *BioResources* 12, 7084–7095. <https://doi.org/10.15376/biores.12.4.7084-7095>.
- Lai, C., Tu, M., Shi, Z., Zheng, K., Olmos, L.G., Yu, S., 2014. Contrasting effects of hardwood and softwood organosolv lignins on enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Bioresour. Technol.* 163, 320–327. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.065>.
- Lourenço, A., Gominho, J., Curt, M.D., Revilla, E., Villar, J.C., Pereira, H., 2016. Steam explosion as a pretreatment of *Cynara cardunculus* prior to delignification. *Ind. Eng. Chem. Res.* 56, 424–433. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.6b03854>.
- Mansfield, S.D., Mooney, C., Saddler, J.N., 1999. Substrate and enzymatic characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnol. Prog.* 15, 804–816. <https://doi.org/10.1021/bp9900864>.
- McMillan, J.D., 1994. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: ACS Symposium Series (USA).
- Neureiter, M., Danner, H., Thomasser, C., Saidi, B., 2002. Dilute acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98, 49–58. <https://doi.org/10.1385/ABAB>.
- Pan, X., Arato, C., Gilkes, N., Gregg, D., Mabey, W., Pye, K., Xiao, Z., Zhang, X., Saddler, J., 2005. Biorefining of softwoods using ethanol organosolv pulping: Preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products. *Biotechnol. Bioeng.* 90, 473–481. <https://doi.org/10.1002/bit.20453>.
- Park, Y.C., Kim, T.H., Kim, J.S., 2017. Effect of organosolv pretreatment on mechanically pretreated biomass by use of concentrated ethanol as the solvent. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 22, 431–439. <https://doi.org/10.1007/s12257-017-0088-1>.
- Pu, Y., Hu, F., Huang, F., Davison, B.H., Ragauskas, A.J., 2013. Assessing the molecular structure basis for biomass recalcitrance during dilute acid and hydrothermal pre-treatments. *Biotechnol. Biofuels* 6, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-15>.
- Quesada-Medina, J., López-Cremades, F.J., Olivares-Carrillo, P., 2010. Organosolv extraction of lignin from hydrolyzed almond shells and application of the δ-value theory. *Bioresour. Technol.* 101, 8252–8260. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.011>.
- Ravindran, R., Jaiswal, A.K., 2016. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: Challenges and opportunities. *Bioresour. Technol.* 199, 92–102. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.106>.
- Rocha, G.J.M., Silva, V.F.N., Martín, C., Gonçalves, A.R., Nascimento, V.M., Souto-Maior, A.M., 2013. Effect of xylan and lignin removal by hydrothermal pretreatment on enzymatic conversion of sugarcane bagasse cellulose for second generation ethanol production. *Sugar Tech* 15, 390–398. <https://doi.org/10.1007/s12355-013-0218-9>.
- Schuerch, C., 1952. The solvent properties of liquids and their relation to the solubility, swelling, isolation and fractionation of lignin. *J. Am. Chem. Soc.* 74, 5061–5067. <https://doi.org/10.1021/ja01140a020>.
- Sharazi, A.M., Van Heiningen, A., 2017. Ethyl xylosides formation in SEW (AVAP®) fractionation of sugarcane straw: Implications for ethanol and xylose recovery. *Holzforchung* 71, 951–959. <https://doi.org/10.1515/hf-2017-0041>.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., 2006. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. *Golden Natl. Renew. Energy Lab.* 11.
- Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J.A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D., 2008. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Lab. Anal. Proced.* 1617, 1–16.
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K., 2007. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *Bioresour. Technol.* 2, 472–499. <https://doi.org/10.15376/biores.2.4.707-738>.
- Vergara, P., Ladero, M., García-Ochoa, F., Villar, J.C., 2018a. Valorization of *Cynara Cardunculus* crops by ethanol-water treatment: Optimization of operating conditions. *Ind. Crops Prod.* 124, 856–862. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.064>.
- Vergara, P., Wojtusik, M., Revilla, E., Ladero, M., García-Ochoa, F., Villar, J.C., 2018b. Wheat straw fractionation by ethanol-water mixture: Optimization of operating conditions and comparison with diluted sulfuric acid pre-treatment. *Bioresour. Technol.* 256, 178–186. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.137>.
- Villar, J.C., Caperos, A., García-Ochoa, F., 1997. Oxidation of hardwood kraft-lignin to phenolic derivatives. Nitrobenzene and copper oxide as oxidants. *J. Wood Chem. Technol.* 17, 259–285. <https://doi.org/10.1080/02773819708003131>.
- Vroom, K.E., 1957. The "H" factor: a means of expressing cooking times and temperatures as a single variable. *PPMC* 58, 228–231.
- Weiss, N.D., Farmer, J.D., Schell, D.J., 2010. Impact of corn stover composition on hemicellulose conversion during dilute acid pretreatment and enzymatic cellulose digestibility of the pretreated solids. *Bioresour. Technol.* 101, 674–678. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.082>.
- Wildschut, J., Smit, A.T., Reith, J.H., Huijgen, W.J.J., 2013. Ethanol-based organosolv fractionation of wheat straw for the production of lignin and enzymatically digestible cellulose. *Bioresour. Technol.* 135, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.050>.
- Wojtusik, M., Villar, J.C., Zurita, M., Ladero, M., García-Ochoa, F., 2017. Study of the enzymatic activity inhibition on the saccharification of acid pretreated corn stover. *Biomass and Bioenergy* 98, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.01.010>.
- Yan, Z., Li, J., Li, S., Chang, S., Cui, T., Jiang, Y., Cong, G., Yu, M., Zhang, L., 2015. Impact of lignin removal on the enzymatic hydrolysis of fermented sweet sorghum bagasse. *Appl. Energy* 160, 641–647. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.02.070>.

- Young, R.A., 1994. Comparison of the properties of chemical cellulose pulps. *Cellulose* 1, 107–130. <https://doi.org/10.1007/BF00819662>.
- Yuan, W., Gong, Z., Wang, G., Zhou, W., Liu, Y., Wang, X., Zhao, M., 2018. Alkaline organosolv pretreatment of corn stover for enhancing the enzymatic digestibility. *Bioresour. Technol.* 265, 464–470. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.038>.
- Zhao, X., Cheng, K., Liu, D., 2009. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 815–827. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1883-1>.
- Zhao, Y., Damgaard, A., Christensen, T.H., 2018. Bioethanol from corn stover – a review and technical assessment of alternative biotechnologies. *Prog. Energy Combust. Sci.* 67, 275–291. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2018.03.004>.

Autores: Priscilla Vergara, Félix García-Ochoa, Miguel Ladero, Soledad Gutiérrez, Juan C. Villar.

Título: Liquor re-use strategy in lignocellulosic biomass fractionation with ethanol-water mixtures.

Revista: Bioresource Technology. 280 (2019) 396-403.

Índice de impacto: 6.669

Categoría: Ingeniería agrícola, biotecnología y microbiología aplicada, combustibles y energía.

Sub-categoría: Biomasa & Utilización de material prima. Conversión enzimática/tratamiento de celulosa/lignocelulosa.

Resumen: Uno de los principales cuellos de botella de la etapa de pre-tratamiento de la BLC está relacionado con los costos asociados a la recuperación del disolvente y a la concentración de los productos con valor añadido recuperados en el licor, lo que afecta al coste total del proceso. En este trabajo se ha propuesto, una vez establecidas las condiciones óptimas (60 min, 160 °C, relación Líquido/Sólido de 20 L/kg y 0,33 % (v/v) de etanol; factor H de 415; *Publicación 1*) de fraccionamiento mediante mezcla de etanol-agua (EW) de la paja de trigo (PT), la estrategia de reutilización del licor del pre-tratamiento, con el objetivo de mejorar la rentabilidad del proceso.

Se ha estudiado la reutilización del disolvente, hasta seis veces, donde después del primer pre-tratamiento (realizado con licor fresco) se ha recuperado el licor (L1), se ha analizado mediante HPLC y se ha mezclado con un volumen adicional de mezcla fresca (para compensar las pérdidas) y, finalmente, se ha utilizado como medio de cocción para el segundo pre-tratamiento. Procediendo de la misma manera, se han realizado cinco cocciones adicionales, en las que los licores de reacción han sido los licores de la cocción precedente lo que en el texto que sigue constituyen los licores L2 a L6. Por otro lado, los sólidos pre-tratados (S1 a S6) fueron secados al aire hasta obtener una humedad constante y después se caracterizaron químicamente (NREL) para medir el efecto del pre-tratamiento

y el efecto del re-uso del licor sobre su composición y calidad para producir un residuo sólido fácilmente hidrolizable.

Los resultados experimentales revelaron que el número de reutilizaciones reduce la recuperación de sólidos (de 52,2 a 42,6 %) y la recuperación de celulosa (de 28,1 a 23,3 %) con un efecto menor o nulo sobre las hemicelulosas y la eliminación de lignina. El efecto más notable es un aumento del rendimiento en glucosa (de 76,7 a 95,3 % después de la hidrólisis enzimática durante 72 h). La acumulación de ácido acético en los licores agotados (hasta 1,3 g/L) parece ser responsable del mayor rendimiento de hidrólisis enzimática, de 76,3 (primer uso) a 87,7 % (quinto reutilización). La reutilización de licor es eficaz para mejorar la sostenibilidad del pre-tratamiento, obteniendo un sólido rico en celulosa fácil de hidrolizar a azúcares, reduciendo el consumo de energía.

Enlace: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852419302573>
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.057>



Liquor re-use strategy in lignocellulosic biomass fractionation with ethanol-water mixtures

Priscilla Vergara^{a,b}, Félix García-Ochoa^b, Miguel Ladero^b, Soledad Gutiérrez^c, Juan C. Villar^{a,*}

^a Laboratory of Cellulose and Paper, Forest Research Center – INIA, Ctra. de La Coruña km 7.5, 28040 Madrid, Spain

^b Chemical Engineering and Materials Department, Faculty of Chemistry, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

^c Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Universidad de la República, Julio Herrera y Reissig 565, 11300 Montevideo, Uruguay

ARTICLE INFO

Keywords:

Liquor re-use

Fractionation

Lignocellulosic biomass

Wheat straw

Enzymatic hydrolysis

ABSTRACT

Liquor recycle in lignocellulosic biomass fractionation with ethanol-water has been studied. Runs have been carried out in a 6 L tank reactor with liquor recirculation. The liquors obtained in six successive fractioning operations have been analyzed together with the solid phase remnant. Experimental results revealed that the number of re-uses reduces solids recovery (from 52.2 to 42.6%) and cellulose recovery (from 28.1 to 23.3%) with minor or no effect on the hemicelluloses and lignin removal. The more remarkable effect is an increase of the glucose yield (from 76.7 to 95.3% after enzymatic hydrolysis during 72 h). The accumulation of acetic acid in the spent liquors (until 1.3 g/L) seems to be responsible of the higher enzymatic hydrolysis yield, from 76.3 (first use) to 87.7% (fifth re-use). Liquor re-use is effective to improve the sustainability of the pre-treatment obtaining a cellulose-rich solid easy to hydrolyse to sugars reducing energy consumption.

1. Introduction

The pre-treatment is a key step in the lignocellulosic biomass (LCB) preparation for hydrolysis and sugar conversion into fuels and chemicals. All the pre-treatments modify the structure and chemical composition of the LCB in order to improve the accessibility of cellulytic enzymes that selectively convert the cellulose into glucose. Several pre-treatment methods have been employed, being steam explosion, dilute acid hydrolysis and water-solvent fractionation the more used (Pandiyani et al., 2018; Vergara et al., 2018c, 2018a). Recently, other efficient alternatives have been employed, such as ionic liquids (Anugwom et al., 2014; Brandt et al., 2013; da Costa Lopes et al., 2013) or advances organosolv type processes (Morais et al., 2016; Toscan et al., 2017).

In previous works (Vergara et al., 2018c, 2018b, 2018a) LCB fractionation with an ethanol-water (EW) mixture has been proposed as a possible alternative to the more common diluted sulfuric acid (DSA) pre-treatment. By varying the experimental conditions of the EW fractionation, it has been demonstrated that this LCB pre-treatment favorably competes with acid hydrolyzed biomass and a high yield in free sugars could be obtained from the enzymatic hydrolysis (EH) of the pulps with a low-moderate energy input.

The main drawback of pre-treatments is the associated costs of energy and product concentration stages: In the case of the water-solvent fractionation they increase with the additional energy involved in the

solvent recovery. This issue is a bottleneck for the development of a cost effective bioprocess which results in increased downstream processing cost, when compared with crude oil alternative (Kalafatakis et al., 2017). Although EW pre-treatment is, apparently, the less favorable pre-treatment in terms of energy consumption (Kautto et al., 2014), it is more efficient in the delignification than steam explosion and diluted acid pre-treatments. Moreover, EW pulps exhibit less inhibition problems in the further saccharification and fermentation stages (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000; Wojtusik et al., 2017).

The cost derived from the solvent recovery is an important drawback and some authors have found the process to be not efficient, for example in the simulation of the ethanol production from hardwoods. Kautto et al. (2014) used the organosolv pre-treatment and determined that, comparing with the diluted acid pre-treatment, this pre-treatment need 34% more energy, provoking the overall process to be not energy self-sufficient. Diverse efforts have been made to address this problem. The more common approach is the use of a minimum liquid/solid (L/S) ratio during the pre-treatment, which allows reducing the size of the equipment, as well as saving energy in solvent recovery and pumping (Zhu and Pan, 2010). However, this solution is not always possible because, at low L/S ratios, the contact between biomass and liquor is not enough to assure a good biomass fractionation. The problem is more relevant for herbaceous biomass than for wood chips, which need, approximately, L/S ratios of 20 L/kg and 10 L/kg, respectively.

* Corresponding author.

E-mail address: villar@inia.es (J.C. Villar).

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.057>

Received 18 December 2018; Received in revised form 9 February 2019; Accepted 11 February 2019

Available online 12 February 2019

0960-8524/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

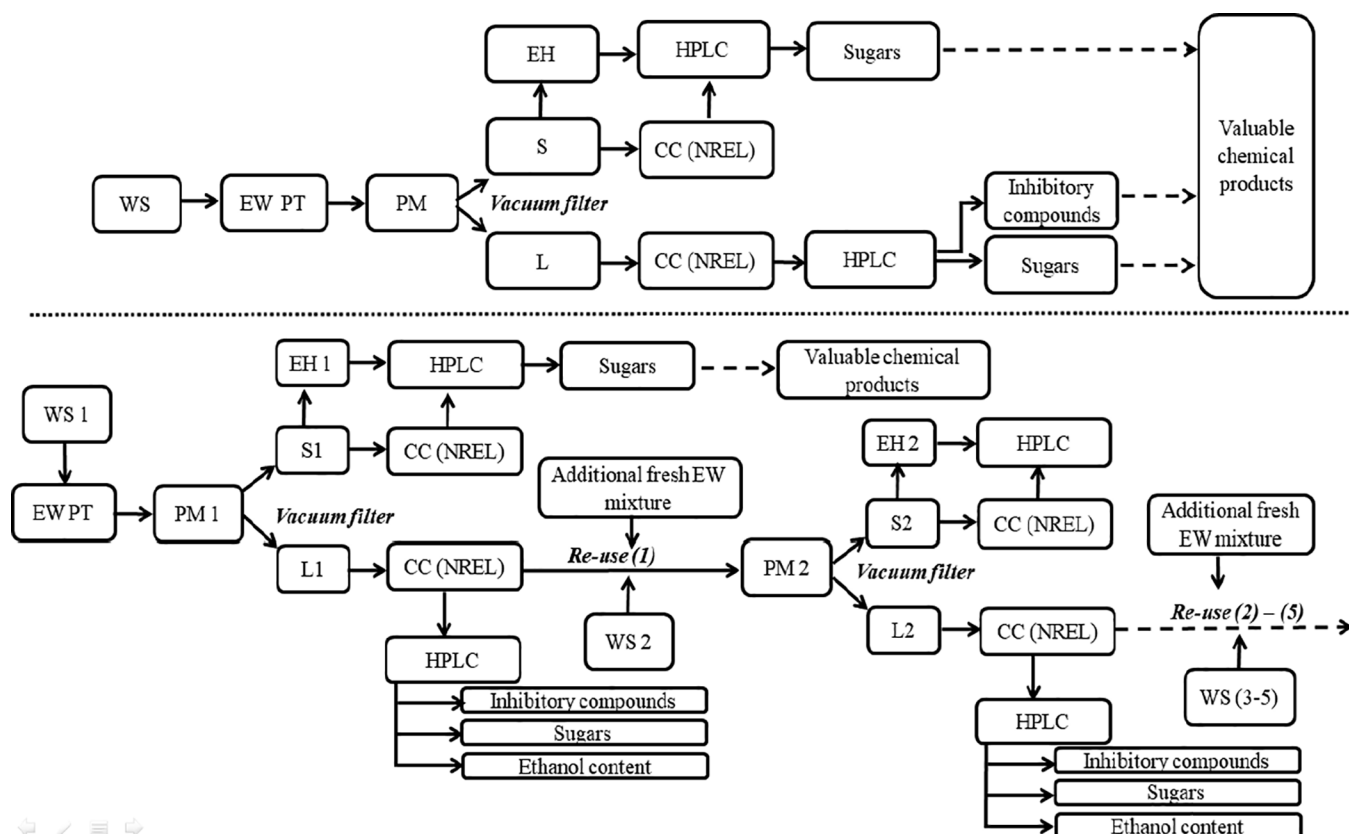


Fig. 1. Conventional pre-treatment operation mode (up) and re-use concept (down) applied to a pre-treatment step. **WS:** Wheat straw; **EW-PT:** Ethanol-water pre-treatment; **PM:** Pre-treated material; **EH:** Enzymatic Hydrolysis; **S:** Solid Fraction; **L:** Liquid fraction; **CC:** Chemical Characterization.

Another possibility is to re-use the spent liquor as cooking liquor for successive treatments, by feed-backing a fraction of the spent liquor. This possibility has been used in the pulp industry to make the cooking stage more selective. The recycle of liquors obtained from the LCB fractionation process minimizes water consumption, the amount of wastewater and energy expenditure, improving the environmental sustainability of the process. However, it leads to an accumulation of substances in the process, which can negatively affect subsequent stages.

A selective fractionation of wheat straw (WS) with acid catalyzed EW liquor has yielded an easy hydrolysable pulp at moderate conditions, such as 160 °C during 60 min (Vergara et al., 2018c). Under these conditions, about 60% of lignin and 80% of hemicelluloses are removed and dissolved in the liquor as low molecular weight lignin, oligomers, sugars and their derivatives. Xylose, lignin derivatives, acetic acid, and furfural are expected to be the more abundant species, which could be an obstacle to re-use the spent liquor in further pre-treatment steps. Lignin has been reported as a strong inhibitor of the EH stage (Lai et al., 2014; Wojtusik et al., 2017), that in addition can re-precipitate on the cellulosic fibers when the temperature goes down at the end of pre-treatment (Donohoe et al., 2008; Selig et al., 2007). Conversely, acetic acid has been used as organic solvent in solvent-water cooking of LCB (Muusinen, 2000; Teramoto et al., 2008) and it could increase the fractionation capacity of the EW mixtures.

At the best of our knowledge, only (Park et al., 2018) have re-used the spent liquor in further cooking of corn stover with EW mixtures. They found a loss of digestibility of glucans and xylans as the number of re-uses increased with a high initial ethanol concentration (greater than 56% w/w), but it is difficult to maintain this high ethanol concentration in successive cookings.

In previous works, employing cardoon (Vergara et al., 2018b) and WS (Vergara et al., 2018c), the LCB was pre-treated with EW mixtures obtaining glucose yields of 72% and 81%, respectively, and only a 25% v/v of ethanol was employed under the optimum conditions. The approach of

the present work is to reduce the cost of solvent recuperation in EW pre-treatment by recycling the spent liquor in successive cooking steps. The liquor re-use allows reducing the heating costs in the recovery of the ethanol and a considerable reduction of the distillation equipment size. Moreover, the concentration of products as acetic acid or furfural in the liquid phase would make it easier and more economic their recuperation.

The aim of this work is to evaluate the liquor recycling strategy in the fractionation stage of the WS by means of EW a mixture. For this purpose, the fractions obtained in the successive re-use of the spent EW liquors will be analyzed in terms of chemical composition and capacity to produce fermentable sugars, as a measurement of the solid fraction quality.

2. Materials and methods

2.1. Raw material and conditioning

The raw material used was WS straw from the region of Castilla-La Mancha, Spain. The preparation of WS prior to experiments is described in a previous work (Vergara et al., 2018c), and the chemical composition consists of 65.1% of polysaccharides (glucans 32.8%, xylans 26.3%, arabinans 3.6% and acetyl groups 2.4%), 13.8% of lignin (insoluble lignin 13.1% and soluble lignin 0.7%), 17.0% of extractives and 4.1% of ash.

2.2. Pre-treatment of wheat straw and enzymatic hydrolysis of solid fraction

The experiments were carried out in a 6 L tank reactor provided with liquor recirculation, temperature control and sampling. The selection of the pre-treatment condition for this work has been based on a previously reported work (Vergara et al., 2018c). The reactor was loaded with 100 g of WS (dry basis) and the solvent at a L/S ratio of 20 L/kg. The fractionation was performed at 160 °C for 60 min (H Factor of 415), with an EW mixture with 25% v/v (28.8% w/w) of ethanol (Panreac, Spain, 96% v/v analytical grade), distilled water and

1% (w/w) of H₂SO₄ as catalyst (Scharlau, Spain, 95% w/w analytical grade) based on WS weight.

A scheme of the experimental approach followed is shown in Fig. 1, where the upper part describes a conventional batch EW pre-treatment and the bottom part, the alternative re-use of the spent hydro-alcoholic liquor. After the first cooking of WS, the first spent liquor (L1) is separated from the solid (S1); an additional volume of fresh EW mixture is added to L1 to compensate losses and the same total volume is employed in the cooking of a second batch of WS. This sequence has been repeated six times and successive concentrated liquors have been obtained (L2–L6), together with the corresponding pre-treated solids (S2–S6). The pre-treated solids have been enzymatically hydrolyzed to obtain a free glucose as main product.

After each one of the pre-treatment runs, the spent liquor (around 1500 mL) was separated from the solid fraction by vacuum filtration. The solid was washed first with 400 mL of fresh EW mixture and then with 2 L of distilled water, the washed solid was homogenized for 5 min in a laboratory disintegrator (Disintegrator MK IIIC, Messmer Instruments Limited, UK). The pulps were filtered; air dried until constant moisture and finally, characterized as indicated in section of Analytical Methods and enzymatically hydrolyzed.

The EW washing liquor is added to the spent liquor and then filtrated to remove precipitated solids. The ethanol concentration (HPLC) and pH were measured in the filtrate and additional ethanol, sulfuric acid and water were added to complete 2 L of EW spent liquor with the same pH and ethanol concentration as the fresh liquor. This liquor was re-used to pre-treat a new batch of WS under the same conditions as the first batch. As indicated above, this procedure is repeated six times until obtaining six solid samples (S1–S6) cooked (except S1) with the spent liquor of the previous cooking.

A sample of WS and the six pre-treated solids fractions were enzymatically hydrolyzed to evaluate cellulose digestibility. Enzymatic hydrolysis was performed in 100 mL Erlenmeyer flasks, using 0.05 M citrate buffer pH 4.8 at 50 °C (citric acid 99.5% and sodium hydroxide 97% w/w, both from Sigma-Aldrich, USA, analytical grade) shaking at 150 rpm, during 72 h, with substrate consistency of 10% (w/v, dry basis). Cellulase (Celluclast 1.5 L) from *Trichoderma reesei* ATCC26924 (Sigma-Aldrich, USA) supplemented with cellobiase (Novozyme 188) (Sigma-Aldrich, USA) was employed as enzymatic cocktail. The labeled activities of cellulase and cellobiase were 70 FPU·g⁻¹ and 1274 IU·g⁻¹, respectively; both activities per gram of enzyme solution. Cellulase and cellobiase were loaded as 20 FPU·g⁻¹ and 40 IU·g⁻¹, respectively. All hydrolysis runs were performed in duplicate. An aliquot of 1 mL hydrolysate was periodically sampled (3, 6, 24, 48 and 72 h) and centrifuged at 1.3·10⁵ rpm (18928 g) for 5 min to separate the hydrolysate from the solid. The supernatant was then filtered through 0.45 µm filter and the liquid analyzed by HPLC (as described in Section 2.3) to measure the sugars concentration. The concentration of glucose was used to calculate glucose yield (GY) according to the following equation (Rocha et al., 2013):

$$GY = \left(\frac{m_g * f_h}{m_c} \right) \times 100 \quad (1)$$

where m_g is the glucose mass in the hydrolyzate (g); f_h is the conversion factor from glucose to cellulose (considering the water addition in cellulose hydrolysis $f_h = 0.9$) and m_c is the amount of cellulose (g) contained in the sample to hydrolyze.

2.3. Analytical Methods

2.3.1. Solid fraction analysis

2.3.1.1. Solid recovery (SR) and solid composition. After each pre-treatment run the solid recovery (SR) was calculated according to the following equation:

$$SR(\%) = \left(\frac{W_p}{W_o} \cdot 100 \right) \quad (2)$$

where W_p is the dry weight of pre-treated material (g) and W_o is the dry weight of the original WS (g) fixed at 100 g. Dry weight was determined gravimetrically by oven drying for 24 h at 105 °C.

Analysis of the raw material and pre-treated solids (S1–S6) was carried out using NREL (National Renewable Energy Laboratory-Golden, CO) methodology. To determine the composition of the solid fractions the standard procedure proposed by the NREL Analytical Methods for Biomass (Hames et al., 2008; Sluiter et al., 2008) was used. The following components were determined: glucans (Gln), xylans (Xyl), arabinans (Ara), acetyl groups (AG), acid insoluble lignin (AIL) and acid soluble lignin (ASL). These responses are defined as:

$$X(\%) = \left(\frac{W_x}{W_o} \cdot 100 \right) \quad (3)$$

where X is the component measured (Gln, Xyl...), W_x is the dry weight of the component in the pre-treated solid (g) and W_o is the dry weight of the original WS (g) fixed at 100 g.

2.3.1.2. Fourier-Transform infrared spectroscopy (FT-IR). FT-IR spectroscopy was used to determine changes in the structure of the solid fraction after EW successive treatments. A Jasco FTIR-4600 spectrophotometer (Jasco, Japan), equipped with an accessory single reflection diamond, was used to obtain the spectra of each sample. Resolution of the spectrophotometer was set at 2 cm⁻¹, and 200 scans were obtained in the 4000–650 cm⁻¹ spectral region. Spectral outputs were recorded in the transmittance mode as a function of wave number.

2.3.1.3. X-ray diffraction (XRD) and crystallinity measurements. The crystallinity of the un-pretreated and chemically treated solids were studied by XRD using a multipurpose PAN analytical diffractometer, model X'Pert MPD (PANalytical BV, Netherlands). The diffractometer is equipped with a copper X-ray tube and two goniometers with vertical configuration θ -2 θ and Bragg-Brentano optic. In this study, the angular range 2 θ was studied between 5° and 40°. The crystallinity was calculated from the diffraction intensity data, and the crystallinity index (CrI, %) was calculated for each sample using the following equation (Segal et al., 1959):

$$CrI(\%) = \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \quad (4)$$

where I_{002} is the intensity of the 002 lattice diffraction at 2 θ = 22.5° and represents both crystalline and amorphous regions while, I_{am} is the intensity of diffraction at 2 θ = 18° and represents the amorphous part (Puri, 1984; Segal et al., 1959).

2.3.2. Liquid fraction analysis

Liquid samples (L1–L6) were filtered through a 0.45 mm membrane and analyzed by HPLC, determining monosaccharides, acetic acid (AA), furfural (F) and HMF concentrations. The analyses were carried out on Agilent Technology 1260 using an Aminex HPX-87H column, at 50 °C, with aqueous mobile phase containing 5 mmol/L of H₂SO₄ (Fluka, Switzerland, 50% HPLC grade) at a flow rate of 0.6 mL/min and refraction index as detector (Agilent 1260 Infinity RID). All the analyses were done by duplicate. Response calibration was made with internal standards of anhydrous glucose (Scharlau, Spain), xylose (Sigma-Aldrich, USA), arabinose (Sigma-Aldrich, USA), acetic acid (Sigma-Aldrich, USA), furfural (Sigma-Aldrich, USA) and HMF (Sigma-Aldrich, USA), all of them of analytical grade.

3. Results and discussion

Six experiments were performed treating LCB with fresh liquor in the first run and re-used liquors in the five successive runs. After each

run cooking of WS, the spent liquor was separated from the solid and mixed with 400 mL of EW solution coming from the solid fraction washing. Additional ethanol, sulfuric acid and water were added to the liquor to complete 2 L of EW liquor with the desired ethanol concentration and pH to carry out a new cooking with fresh solid. Six liquid samples (L1–L6) and six solid samples (S1–S6) are taken for later analysis. The results of these samples of the solid and liquid fractions of the different runs are commented in the next points.

3.1. Solid fraction analysis results

3.1.1. Solid recovery and solid composition

After the different pre-treatment runs, several parameters of the solid samples were determined: the SR, the polysaccharide composition (Gln, Xln, Ara and AG, and AIL). The results are shown in Fig. 2, where the evolution of these variables can be seen in the six runs, five of which were performed with spent liquors. The values corresponding to the first pre-treatment (S1), with fresh EW liquor, are in agreement with those reported previously (Vergara et al., 2018c) when similar pre-treatment conditions (energy supplied, given by H factor value) were used. As can be observed, there is a high recovery of glucans in the solid, high hemicelluloses removal (Xyl, Ara) and a good level of delignification in relation with the wheat straw initial values.

The trend of the successive pre-treatments shows that, after the first one, the SR slowly decreases from S1 to S6, as can be seen in Fig. 2a, with an overall difference less than 10% (on the initial WS). This effectiveness loss must be mainly due to the lack of selectivity because of the re-use of EW-spent liquor that make the EW media more aggressive for the cellulose, as can be noted in Fig. 2b. The fraction of hemicelluloses is the most reactive; thus, the first pre-treatment run greatly reduces the concentration of Xyl and Ara in pulps, and then successive re-uses of the spent liquor are not able to extract additional material and no significant changes are observed in the different runs, as can be observed in Fig. 2c and 2d. In a previous work (Vergara et al., 2018c), it was found that, in a pre-treatment of EW fractionation to WS, there are no significant variations in xylans removal when the H Factor (energy input) takes a value above 400. Lignin concentration in pulps seems not

to be influenced by the composition of spent liquors, as can be seen in Fig. 2e. All the cooking liquors have the same delignification capacity and no significant changes in delignification were observed when the liquor composition changes in samples from L1 to L6. Finally, the evolution of acetyl groups (Fig. 2f) has a similar behavior to that commented for xylans and arabinans to which acetyl groups are associated. There is a continued decrease in the acetyl group content in the three first successive re-uses, becoming stabilized between 0.2 and 0.3% for the two last re-uses.

3.1.2. Structural characterization of the solid samples

The structural characteristics of the original solid (WS) and of the pre-treated solids obtained in the runs (S1–S6) have been analyzed by spectroscopy FT-IR, X-ray diffraction (XRD) and electronic microscopy (SEM).

3.1.2.1. Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR). The FT-IR analysis was carried out in order to identify the changes in the functional groups that have been caused by the pre-treatment conditions. The CH₂ stretch bands observed at approximately 2850 and 2920 cm⁻¹ represent the aliphatic wax fractions (Merk et al., 1998); as can be seen, all the signals increase in the successive runs (S1–S6). The band at 896 cm⁻¹, attributed to the β-(1-4)-glycosidic bond (C-O-C), is the characteristic absorption peak of cellulose (Alemdar and Sain, 2008; Xiao et al., 2001); this peak shows a great intensity in the pre-treated materials because the cellulose content increases after the solid pre-treatment. Similarly, the band at 3350 cm⁻¹, associated with the stretching of O-H from the hydrogen bonds of cellulose, and also the band at 2900 cm⁻¹, attributed to the stretching of C-H within the methylene of cellulose (Xiao et al., 2001) increase from run to run.

Stretching of the aromatic rings of the lignin in the WS are represented by the peaks at 1507 and 1436 cm⁻¹ (Sun et al., 2005; Xiao et al., 2001). The intensity of these peaks should decrease due to the delignification of the EW pre-treatment, however the opposite behavior is observed. The relative increase in lignin concentration due to the elimination of hemicelluloses does not seem not enough to justify the increase of these peaks and the lignin re-position on the solids surface is proposed as an explanation for the increase in peaks intensity (Sun et al., 2005; Xiao et al., 2001). The dominant peaks in the region between 3600 and 2800 cm⁻¹ are due to stretching vibrations of C-H and OH (Alemdar and Sain, 2008).

3.1.2.2. X-ray diffraction (XRD) and crystallinity measurements. The cellulose crystallinity is able to influence the LCB behavior. Thus, the enzymatic digestibility of LCB varies according to this variable: the low crystallinity areas (amorphous) have greater susceptibility to be hydrolyzed than areas with a higher crystallinity (Zhao et al., 2008). To determine the influence of re-use of EW liquors on the crystallinity of the solid phases generated in the successive re-use liquors, the XRD patterns and the relative amount of crystalline cellulose in the pre-treated solids (CrI) were determined; the results are given in Table 1. The peak found at 16° (1 0 1) is attributed to amorphous cellulose, while the peak appearing at 22.5° (0 0 2) is attributed to crystalline cellulose (Segal et al., 1959). The CrI of the original solid (WS) is 67.5%; this value is increased to 75.9% after the first pre-treatment (S1) and increases gradually in the following runs performed with the spent EW liquors, reaching a maximum value of 80.5% (S6). This increase is due to the removal of amorphous cellulose (more accessible) hemicelluloses and lignin, caused by the pre-treatment (Puri, 1984; Zhao et al., 2008) resulting in a cellulose-rich solid with higher concentration of crystalline cellulose.

Other authors have pre-treated similar raw materials but the CrI values of the cellulosic solids have been clearly inferior to those cited above, regardless of the fractionation media. Chen et al. (2015) pre-treated WS with EW liquor (60% ethanol w/w, at 190 °C for one hour) obtaining a cellulose rich solid with 54% of crystallinity. Sugarcane

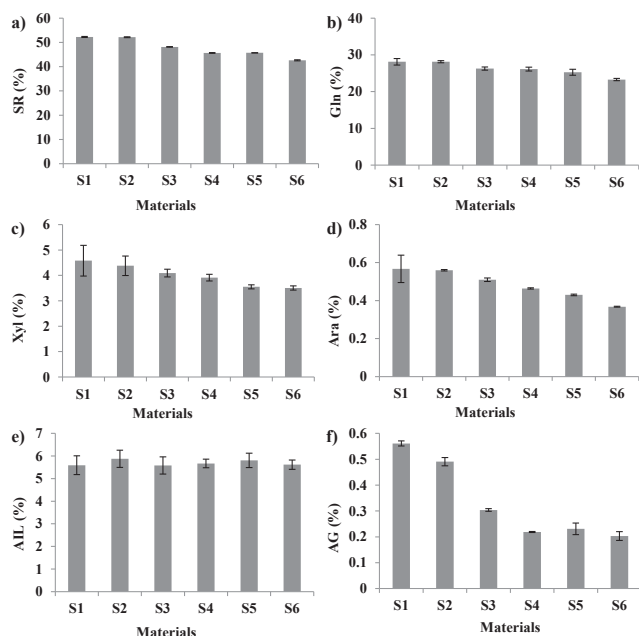


Fig. 2. Chemical characterization of the solid fractions obtained after the EW pre-treatment (% on dry weight of WS). a) Solid recovery (SR), b) Glucans (Gln), c) Xylans (Xyl), d) Arabinans (Ara), e) Acid insoluble lignin (AIL) and f) Acetyl groups (AG).

Table 1
Crystallinity (CrI) of wheat straw and pre-treated solids.

Run	CrI (%)	Increase (%)
WS	67.50	–
S1	75.93	12.49
S2	75.84	12.36
S3	76.75	13.71
S4	80.22	18.86
S5	80.04	18.58
S6	80.55	19.34
S1 + AA	75.55	11.94

bagasse pre-treatment with peracetic acid (60% peracetic acid w/w, at 80 °C for two hours) yielded a solid with a CrI value of 63% (Zhao et al., 2008). In other work, the WS pre-treatment with imidazole (at 170 °C for two hours) produced a cellulosic solid with CrI value of 66% (Morais et al., 2016).

3.1.2.3. Scanning electron microscopy (SEM). The morphological changes caused on the solid fractions when WS was treated with re-used liquors were observed by SEM. As can be seen, the original solid (WS), without pre-treatment has zones with amorphous flakes and other areas with a rigid and compact laminar structure, which is related to the low enzymatic digestibility. The successive EW pre-treatments remove hemicelluloses and lignin, destroying the structure and disrupting and bending the fibers. In addition, fibers separation increases the active area for the access of enzymes to the substrate (Kumar and Wyman, 2009) while after an intensive re-use of the spent liquor causes the apparition of sphere-shape particles that could correspond with lignin re-precipitation (Donohoe et al., 2008; Selig et al., 2007).

3.2. Liquid fraction analysis results

The composition (g/L) of liquors obtained after each pre-treatment is presented in Fig. 3. As it was expected, as the number of re-uses increases, the liquor becomes more concentrated in free sugars and their associated compounds, generated by hydrolysis and/or degradation. The xylose, the main component of the WS hemicelluloses, was the monosaccharide found in higher concentration (from 0.8 to 11.7 g/L), increasing in the successive pre-treatments, samples L1–L6. Arabinose concentration reaches c.a. 2.0 g/L, while glucose, released from cellulose, was always found in low concentrations (from 0.03 to 0.8 g/L) but increasing from L1 to L6.

During the fractionation, the degradation of the structural components of the LCB occurs at severe conditions, generating compounds with inhibitory effects in the further stages of hydrolysis and fermentation. These compounds are mainly concentrated in the spent liquor,

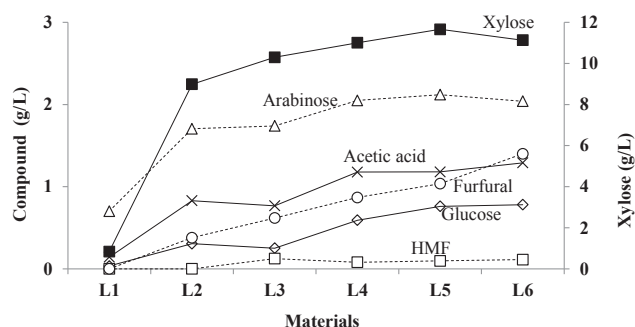


Fig. 3. Composition of the liquid fractions (L1–L6) obtained after wheat straw pre-treatments with successive liquor re-uses. **Left axis:** Arabinose Δ -, Acetic acid \times -, Furfural \circ -, Glucose \diamond - and Hydroxy Metil Furfural (HMF) \square -. **Right axis:** Xylose \blacksquare -.

but also retained in the solid fraction and not completely eliminated in the washing stage. These inhibitory compounds could be weak acids, as acetic acid, furan derivatives (HMF and furfural) and phenolic compounds (Almeida et al., 2007; Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000; Sun and Cheng, 2002). In this work, only the concentration of the first two categories was measured. It can be pointed out that the concentration of degradation products of sugars has different behaviors. Thus, furfural increases its concentration from L1 to L6, but HMF concentration remains almost constant with the re-use of the liquors. Furfural is obtained in higher concentrations (1.4 g/L in L6) than HMF (0.1 g/L in L6), which is related to the more labile nature of the pentoses and their higher concentrations in the liquid phase (Almeida et al., 2007). As expected, the concentration of acetic acid in the hydrolysate constantly increases from 0.1 g/L (L1) to 1.3 g/L (L6), with the re-use of spent liquor. This can be explained by the de-acetylation of hemicelluloses that, in a sulfuric acid medium, converts the acetyl groups into acetic acid. Organosolv cooking with organic acids, in this case with acetic acid, has been explored due to its delignifying capacity, which could mean that acetic acid accumulation in the cooking liquor could improve the capacity to fractionate lignocellulose (Muusinen, 2000).

Thus, the re-use of spent liquors obtained from the EW lignocellulose fractionation would minimize water use and energy consumption in the recovery of solvent, improving the environmental sustainability of the global process. However, the accumulation of substances in the liquid phase can, on the one hand, negatively affect subsequent stages or the quality of the cellulose-rich solid or, on the other hand, facilitate the liquor capacity to remove lignin and hemicelluloses.

3.3. Enzymatic hydrolysis of the raw material and pre-treated solids

Enzymatic digestibility is one of the main criteria to evaluate the effectiveness of a pre-treatment (Vergara et al., 2018c). The yields of glucose (GY) of the WS pulps are shown in Fig. 4 for the solid fractions obtained in the successive re-uses. As can be seen, the re-use of the liquor has a positive effect on the cellulose hydrolysis, which is faster. As the number of re-cycles increases the glucose yield of the solid is progressively higher and these differences are maintained after 72 h of hydrolysis reaction, although the results are very similar for the three last experiments, when the liquors are re-used 3, 4 and 5 times. Thus, in the case of solid S1, obtained with the non re-used liquor, the GY reaches 76.7% at 72 h, while successive re-uses increase this value from 82.3% (S2) to 95.3% (S6). This increase in the glucose produced compensates the lower cellulose recovery obtained when the EW liquor is re-used more than 3–4 times. In all the runs, the glucose yield obtained from the EW pre-treated WS was similar, or even superior, to the yields found by other authors that used high-energy conditions in the pre-treatment. A discussion of this topic was presented in a previous work (Vergara et al., 2018c).

As commented above, the results of the re-use in the runs performed with re-used liquors for third to sixth time, samples S3 to S6, the GY values are very similar and higher than those found in the two first runs, samples S1 and S2. The same GY value is reached in the solids S4 to S6 in 24 h, while a similar GY value is reached in sample S3 in 48 h, and in samples S1 and S2 are needed 72 h to reach a similar value. If the glucose conversion rate is calculated (by derivation of glucose concentration with time), the initial hydrolysis rate for the solid S1 is 8.6 (g glucose h^{-1}), this rate increases till a value of 13.3 (g glucose h^{-1}) for the solid obtained with the first re-use of the liquor (S2) and the increase continues in the successive re-uses until a maximum of 14.6 (g glucose h^{-1}) for the S6 solid.

This higher GY values can be explained by some previous findings in the literature. The un-branched hemicelluloses present in the LCB are bound to the cellulose surface by hydrogen bonding, while the branched ones and their side chains can be bound covalently to lignin to create cross-links lignin-carbohydrate complexes impenetrable for cellulosic enzymes; thus, this cleavage can open the structure of the

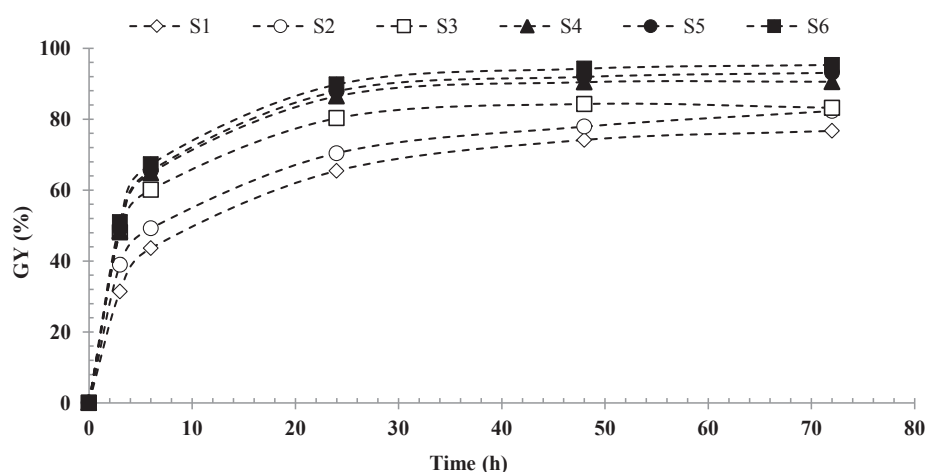


Fig. 4. Evolution with time of the glucose yield obtained by enzymatic hydrolysis of the pre-treated solids obtained by EW fractionation of wheat straw after successive re-use of the spent liquors.

cell wall of the plant and, therefore, improve the performance of the hydrolytic stage (Hu and Ragauskas, 2012). On the other hand, acetyl groups can increase the size of the cellulose chain, which increases the steric hindrance for enzymatic binding (Larsson et al., 1995). Its elimination is also recognized as a favorable factor to obtain a better performance of the enzymatic hydrolysis, as observed when re-using the pre-treatment liquids, where a gradual increase was observed.

By successively re-using of the liquors, a decrease in the acetyl groups content in the solid fraction is observed, which has been reported as another factor influencing the enzymatic hydrolysis, since it can affect the interaction between enzymes and cellulose. It has also been reported that when the hydroxyl groups of the cellulose are replaced by acetyl groups, the bonding between the OH of the cellulose and the amino acid residues of the cellulase is not achieved, which can affect the GY values (Boudet et al., 2003). The results obtained by several authors (Chang and Holtzapple, 2000; Kim and Holtzapple, 2006; Pan et al., 2006; Zhu and Pan, 2010) for poplar wood, WS and corn stubble, respectively, have shown that the decrease of the content of acetyl groups provokes the swelling of the material and its digestibility improves. Therefore, the pre-treatment of EW (acid catalyzed) used, and the successive re-use of the spent liquors (up to a total of five times) is a good method for the WS fractionation with water and energy savings in the pre-treatment and further solvent recovery. It also allows obtaining a solid that continuously improves its digestibility in spite of diminishing its cellulose content.

To identify possible factors influencing the enzymatic hydrolysis, trying to explain the positive effect achieved by successively re-using the liquors, the effect of the accumulation of acetic acid, an organic compound used in the Organosolv delignification, has been considered. A new experiment was carried out, adding this compound to the liquid medium, at the same concentrations found in the last re-use experiment, analyzing the enzymatic hydrolysis rate and the chemical composition of the solid obtained with the acetic acid-EW liquor (AA) and comparing with the GY values obtained with the samples S1 and S6.

By adding acetic acid to the pre-treatment medium, an SR of 49.6% is obtained, slightly lower than that obtained with S1 (first step), but not as low as that achieved with the pre-treatment using the liquor re-used for the fifth time (S6). The chemical composition of the pre-treated solid is similar to those of the set from S1 to S6. Cellulose concentration was high and 31.8 g remains in the solid pre-treated with the AA liquor (32.8 g in WS), something higher than the values found in S1 and S6, 28.1 g and 23.3 g, respectively. Delignification is a bit higher in this sample, obtained by addition of AA, in comparison with the results of S1 and S6, only 4.6 g of insoluble lignin remain in the solid isolated with AA liquor, while in S1 and S6 remain 5.6 g in both cases (13.1 g in WS). The hemicelluloses content shows little variations because always

a maximum HX is achieved (approximately 85%). The amounts of residual xylans in the solids are 4.0 g for the AA and 4.6 g and 3.5 g for S1 and S6, respectively. Arabinans in the solids were always in low concentration, 0.2 g, 0.6 g and 0.4 g for AA, S1 and S6, respectively, showing the AA liquor the highest removal capacity (95.5%). In summary, the presence of acetic acid in the re-used cooking liquor could have an effect on the chemical composition of the pre-treated solids but only noticeable in the higher cellulose content, the opposite trend of the series of re-uses, and a better delignification, which fits the trend of the liquor re-use. Thus, other non-controlled substances could be partially responsible of the observed effects.

Finally, the GY values of the solid obtained with the treatment with fresh liquor plus acetic acid (S1 + AA) has been measured and compared with the values in solids obtained with spent liquor re-used and with fresh EW liquor. Table 2 shows the GY values for three cases: solids S1, S6 and S1 + AA (obtained in the run using S1 adding AA). The best performance is obtained from solid S6, which was obtained with liquor re-used five times, yielding a 95% of glucose at 72 h of hydrolysis, although a GY of 94% is obtained in only 48 h. In the opposite case, S1 solid, obtained with fresh EW liquor, only reach a yield of 77% of glucose after 72 h. When acetic acid (at the concentration found in the liquor corresponding to S5) was added to the fresh EW liquor, the enzymatic hydrolysis of the pre-treated solid was clearly improved, with a progressive increase of the glucose yield that supposes a 83% after only 48 h and a 90% at 72 h. This means that the presence of acetic acid in the re-used liquor could be responsible (at least in part) of the differences found in the saccharification rate of solids produced with fresh liquor and with re-used liquors.

One possibility for the better digestibility of the solids pre-treated with the re-used liquors could be the change in the cellulose crystallinity. However, when the CrI of the solid obtained with the treatment with S1 + AA liquor was measured, it showed a value of 75.6%, very similar to that measured by the S1 (75.9%) and below the 80.6% corresponding to S6, which discards that the effect of the acetic acid on the

Table 2

Glucose yield after enzymatic hydrolysis of the solids pre-treated with fresh liquor (S1), with five times re-used liquor (S6) and with fresh liquor + acetic acid (S1 + AA).

Glucose Yield (%)		
Run	48 h	72 h
S1	74.1 ± 1.7	76.7 ± 2.3
S6	94.2 ± 0.9	95.3 ± 1.2
S1 + AA	83.3 ± 1.1	89.7 ± 0.8

cellulose hydrolysis must be due to a change in the crystallinity. The other change that could contribute to a better enzymatic digestibility of the cellulose is a more extensive delignification. As mentioned before, the addition of acetic acid to the fresh EW liquor has supposed little reduction in the lignin content of the solid (from 5.6 g to 4.6 g). This reduction, not very different, supposes an increase in delignification from 57.3% to 64.9%, which can partially favor the cellulases access to the solids. In resume, the accumulation of acetic acid in the re-used liquors seems to be a cause for the improvement in the digestibility of cellulose-rich solids. However, the mechanisms of this improvement in digestibility are not yet fully understood.

4. Conclusions

EW pre-treatment is effective to fractionate LCB although solvent recovery consumes a high amount of energy. Re-use of the spent liquors is an alternative to reduce energy spent and costs. The successive re-uses of liquors slightly modifies the chemical composition of the solids obtained, with a moderate loss of cellulose as the number of re-uses increases. The most outstanding effect of re-use is the increase of the solid digestibility, given by the glucose yield, reaching a value of 95%. The hydrolysis rate increases with solids obtained when re-used liquors are employed, which can be partially due to the accumulation of acetic acid in the spent liquor.

Acknowledgements

This work has been supported by MINECO Project CTQ2017-84963-C2. The support of the Madrid Regional Government (Project Reto ProsoT P2013-MAE2907) and CONICYT/BECAS CHILE/2015 (reference 72160108) for a grant to PV, and the Fundación Carolina (Spain) (reference 770805) and CSIC-Uruguay (reference MIA-417), for funding a post-doctoral grant (SG).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.057>.

References

- Alemdar, A., Sain, M., 2008. Isolation and characterization of nanofibers from agricultural residues – wheat straw and soy hulls. *Bioresour. Technol.* 99, 1664–1671. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.029>.
- Almeida, J.R., Modig, T., Petersson, A., Hahn-Hägerdal, B., Lidén, G., Gorwa-Grauslund, M.F., 2007. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82, 1115–1121. <https://doi.org/10.1002/jctb.1676>.
- Anugwom, I., Eta, V., Virtanen, P., Mäki-arvela, P., Hedenström, M., 2014. Switchable Ionic Liquids as Delignification Solvents for Lignocellulosic Materials. *ChemSusChem* 1170–1176. <https://doi.org/10.1002/cssc.201300773>.
- Boudet, A.M., Kajita, S., Grima-Pettenati, J., Goffner, D., 2003. Lignins and lignocelluloses: a better control of synthesis for new and improved uses. *Trends Plant Sci.* 8, 576–581. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2003.10.001>.
- Brandt, A., Gräsvik, J., Hallett, J.P., Welton, T., 2013. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chem.* 15, 550–583. <https://doi.org/10.1039/C2GC36364J>.
- Chang, V.S., Holtzapfel, M.T., 2000. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. In: *Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*, pp. 5–37.
- Chen, H., Zhao, J., Hu, T., Zhao, X., Liu, D., 2015. A comparison of several organosolv pretreatments for improving the enzymatic hydrolysis of wheat straw: Substrate digestibility, fermentability and structural features. *Appl. Energy* 150, 224–232. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.04.030>.
- da Costa Lopes, A.M., João, K.G., Rubik, D.F., Bogel-Lukasik, E., Duarte, L.C., Andreus, J., Bogel-Lukasik, R., 2013. Pre-treatment of lignocellulosic biomass using ionic liquids: wheat straw fractionation. *Bioresour. Technol.* 142, 198–208. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.032>.
- Donohoe, B.S., Decker, S.R., Tucker, M.P., Himmel, M.E., Vinzant, T.B., 2008. Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment. *Biotechnol. Bioeng.* 101, 913–925. <https://doi.org/10.1002/bit.21959>.
- Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, A., Sluiter, J., Templeton, D., 2008. Preparation of Samples for Compositional Analysis Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date: 8/06/2008 Preparation of Samples for Compositional Analysis Laboratory Analytical Procedure (LAP). *Natl. Renew. Energy Lab.*, pp. 1–9.
- Hu, F., Ragauskas, A., 2012. Pretreatment and lignocellulosic chemistry. *Bioenergy Res.* 5, 1043–1066. <https://doi.org/10.1007/s12155-012-9208-0>.
- Kalafatakis, S., Braekvelt, S., Carlsen, V., Lange, L., Skiadas, I.V., Gavalas, H.N., 2017. On a novel strategy for water recovery and recirculation in biorefineries through application of forward osmosis membranes. *Chem. Eng. J.* 311, 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.11.092>.
- Kautto, J., Realf, M.J., Ragauskas, A.J., Kässi, T., 2014. Economic analysis of an organosolv process for bioethanol production. *Bioresour. Technol.* 155, 6041–6072. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.040>.
- Kim, S., Holtzapfel, M.T., 2006. Effect of structural features on enzyme digestibility of corn stover. *Bioresour. Technol.* 97, 583–591. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.03.040>.
- Kumar, R., Wyman, C.E., 2009. Effect of additives on the digestibility of corn stover solids following pretreatment by leading technologies. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 1544–1557. <https://doi.org/10.1002/bit.22203>.
- Lai, C., Tu, M., Shi, Z., Zheng, K., Olmos, L.G., Yu, S., 2014. Contrasting effects of hardwood and softwood organosolv lignins on enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Bioresour. Technol.* 163, 320–327. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.065>.
- Larsson, P.T., Westermark, U., Iversen, T., 1995. Determination of the cellulose I α allomorph content in a tunicate cellulose by CP/MAS ¹³C-NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 278, 339–343. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(95\)00248-0](https://doi.org/10.1016/0008-6215(95)00248-0).
- Merk, S., Blume, A., Riederer, M., 1998. Phase behaviour and crystallinity of plant cuticular waxes studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Planta* 204, 44–53. <https://doi.org/10.1007/s004250050228>.
- Morais, A.R.C., Pinto, J.V., Nunes, D., Roseiro, L.B., Oliveira, M.C., Fortunato, E., Bogel-Lukasik, R., 2016. Imidazole: prospect solvent for lignocellulosic biomass fractionation and delignification. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 4, 1643–1652. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b01600>.
- Muusinen, E., 2000. Organosolv pulping: a review and distillation study related to peroxoacid pulping. *Oulun yliopisto* 2000. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(91\)90105-S](https://doi.org/10.1016/0960-8524(91)90105-S).
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour. Technol.* 74, 25–33. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00161-3).
- Pan, X., Gilkes, N., Saddler, J.N., 2006. Effect of acetyl groups on enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates. *Holzforschung* 60, 398–401. <https://doi.org/10.1515/HF.2006.062>.
- Pandiyani, K., Singh, A., Singh, S., Saxena, A.K., Nain, L., 2018. Technological interventions for utilization of crop residues and weedy biomass for second generation bioethanol production. *Renew. Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.08.049>.
- Park, Y.C., Kim, T.H., Kim, J.S., 2018. Flow-through pretreatment of corn stover by recycling organosolv to reduce waste solvent. *Energies* 11, 1–8. <https://doi.org/10.3390/en11040879>.
- Puri, V.P., 1984. Effect of crystallinity and degree of polymerization of cellulose on enzymatic saccharification. *Biotechnol. Bioeng.* 26, 1219–1222. <https://doi.org/10.1002/bit.260261010>.
- Rocha, G.J.M., Silva, V.F.N., Martín, C., Gonçalves, A.R., Nascimento, V.M., Souto-Maior, A.M., 2013. Effect of Xylan and Lignin removal by hydrothermal pretreatment on enzymatic conversion of sugarcane bagasse cellulose for second generation ethanol production. *Sugar Tech* 15, 390–398. <https://doi.org/10.1007/s12355-013-0218-9>.
- Segal, L., Creely, J.J., Martin, A.E., Conrad, C.M., 1959. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Text. Res. J.* 29, 786–794. <https://doi.org/10.1177/00405175590290103>.
- Selig, M.J., Viamajala, S., Decker, S.R., Tucker, M.P., Himmel, M.E., Vinzant, T.B., 2007. Deposition of lignin droplets produced during dilute acid pretreatment of maize stems retards enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnol. Prog.* 23, 1333–1339. <https://doi.org/10.1021/bp0702018>.
- Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J.A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D., 2008. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Lab. Anal. Proc.* 1617, 1–16.
- Sun, X.F., Xu, F., Sun, R.C., Fowler, P., Baird, M.S., 2005. Characteristics of degraded cellulose obtained from steam-exploded wheat straw. *Carbohydr. Res.* 340, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.10.022>.
- Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review q. *Bioresour. Technol.* 83, 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7).
- Teramoto, Y., Lee, S.H., Endo, T., 2008. Pretreatment of woody and herbaceous biomass for enzymatic saccharification using sulfuric acid-free ethanol cooking. *Bioresour. Technol.* 99, 8856–8863. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.04.049>.
- Toscan, A., Morais, A.R.C., Paixão, S.M., Alves, L., Andreus, J., Camassola, M., Dillon, A.J.P., Lukasik, R.M., 2017. Effective extraction of lignin from elephant grass using imidazole and its effect on enzymatic saccharification to produce fermentable sugars. *Ind. Eng. Chem. Res.* 56, 5138–5145. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.6b04932>.
- Vergara, P., Ladero, M., García-Ochoa, F., Villar, J.C., 2018. Pre-treatment of corn stover, *Cynara cardunculus* L. stems and wheat straw by ethanol-water and diluted sulfuric acid: comparison under different energy input conditions. *Bioresour. Technol.* 270, 449–456. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.058>.
- Vergara, P., Ladero, M., García-Ochoa, F., Villar, J.C., 2018. Valorization of *Cynara Cardunculus* crops by ethanol-water treatment: optimization of operating conditions. *Ind. Crops Prod.* 124, 856–862. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.064>.
- Vergara, P., Wojtusik, M., Revilla, E., Ladero, M., García-Ochoa, F., Villar, J.C., 2018. Wheat straw fractionation by ethanol-water mixture: optimization of operating conditions and comparison with diluted sulfuric acid pre-treatment. *Bioresour. Technol.* 256, 178–186. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.137>.

- Wojtusik, M., Villar, J.C., Zurita, M., Ladero, M., Garcia-Ochoa, F., 2017. Study of the enzymatic activity inhibition on the saccharification of acid pretreated corn stover. *Biomass Bioenergy* 98, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.01.010>.
- Xiao, B., Sun, X.F., Sun, R.C., 2001. Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali-soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stems, rye straw, and rice straw. *Polym. Degrad. Stab.* 74, 307–319. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(01\)00163-X](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(01)00163-X).
- Zhao, X.-B., Wang, L., Liu, D.-H., 2008. Peracetic acid pretreatment of sugarcane bagasse for enzymatic hydrolysis: a continued work. *J. Chem. Technol. Biotechnol. Int. Res. Process. Environ. Clean Technol.* 83, 950–956. <https://doi.org/10.1002/jctb.1889>.
- Zhu, J.Y., Pan, X.J., 2010. Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: technology and energy consumption evaluation. *Bioresour. Technol.* 101, 4992–5002. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.007>.

Autores: Priscilla Vergara, Miguel Ladero, José M^a Carbajo, Félix García-Ochoa, Juan C. Villar.

Título: Use of additives to improve the enzymatic hydrolysis of pre-treated wheat straw with an ethanol-water mixture.

Revista: Biomass & Bioenergy.

Índice de impacto: 3.537

Categoría: Procesos de conversión de bioenergía.

Sub-categoría: Conversión termoquímica.

Resumen: Se ha estudiado la hidrólisis enzimática (HE) de la paja de trigo (PT) pre-tratada mediante mezclas de etanol-agua (EW), donde la inhibición de las celulasas debido a la lignina se ha identificado como la causa de la disminución del rendimiento y la velocidad de HE de la biomasa lignocelulósica (BLC). Varios aditivos han sido considerados como potenciales mejoradores del rendimiento de glucosa en la HE.

El objetivo de este trabajo ha sido determinar el efecto del uso de diferentes aditivos en el rendimiento de la HE, basándose en la idea de que la conversión de celulosa en glucosa se vería mejorada al hacer que las enzimas estén más disponibles para las reacciones de hidrólisis.

Los aditivos que se emplearán son surfactantes no iónicos, como Tween 80 y polietilenglicol-6000, y proteínas, como la albúmina de suero bovino (BSA), la caseína (CAS) y la leche desnatada en polvo. En todos los casos, se emplearán tres concentraciones diferentes de estos aditivos, que se verifican en PT pre-tratada bajo dos condiciones de operación, alta y baja severidad.

Los resultados obtenidos señalan que el contenido de lignina de la BLC pre-tratada tiene una influencia decisiva para alcanzar un alto rendimiento en la sacarificación enzimática. Un mecanismo que involucre el bloqueo de la lignina por surfactantes o proteínas explicaría por qué los sustratos con alto contenido de lignina son, en proporción, los más beneficiados

por el empleo de aditivos. Los aditivos controlados tienen un efecto moderado sobre la tasa de hidrólisis de la glucosa. La opción más favorable combina una alta deslignificación con el uso de una proteína barata como la CAS, alcanzando un aumento del 6 % en el rendimiento de glucosa cuando se usan las mejores condiciones.

Enlace: *Submitted for publication.*

Manuscript Number:

Title: Use of additives to improve the enzymatic hydrolysis of pre-treated wheat straw with an ethanol-water mixture

Article Type: Research paper

Keywords: Enzymatic hydrolysis; Wheat straw; Additives; Non-ionic surfactants; Proteins

Corresponding Author: Dr. Juan Carlos Villar, Ph. D.

Corresponding Author's Institution: INIA - Instituto Nacional de Investigacion y Tecnologia Agraria y Alimentaria

First Author: PRISCILLA VERGARA, B. S.

Order of Authors: PRISCILLA VERGARA, B. S.; MIGUEL LADERO, Ph. D.; JOSE M CARBAJO, Ph. D.; FELIX GARCIA-OCHOA, Ph. D.; Juan Carlos Villar, Ph. D.

Abstract: Enzymatic hydrolysis of pre-treated wheat straw has been studied. Several additives have been considered as potential improvers of glucose yield in the enzymatic hydrolysis. The inhibition of cellulases by the lignin has been identified as a cause of the decrease of the effectiveness and rate of the enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. Non-ionic surfactants, such as Tween 80 (poly(oxyethylene)20-sorbitan-monooleate) and polyethylene glycol-6000, and proteins, as bovine serum albumin, casein and skimmed milk powder, have been used to improve the sugars yield in the enzymatic hydrolysis stage. The enzymatic saccharification has been studied for two pre-treated wheat straw materials, one with high delignification and another with low delignification. Three concentrations of each additive have been considered. The results obtained point out that the lignin content of the pre-treated lignocellulosic biomass has a decisive influence in reaching a high yield in the enzymatic saccharification. The additives checked have a moderate effect on the glucose hydrolysis rate. The more favorable option combines high delignification with the use of a cheap protein as casein, reaching a glucose yield increase of 6 % when the best conditions are used.

Suggested Reviewers: ANA LOURENÇO Ph.D.
professor, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa University
analourenco@isa.ulisboa.pt
Expert in cardoon valorisation, chemistry of lignocellulose and lignocellulosic biorefineries

ALEJANDRO RODRÍGUEZ Ph.D.
professor, Chemical Engineering, Cordoba University, Spain
q42ropaa@uco.es
Long experience in thermo-chemical valorization of lignocellulosic biomass. Expert in chemistry of lignocellulosic materials.

LUIZ RAMOS Ph.D.

professor, Chemistry department, Universidad Federal do Parana
luiz.ramos@ufpr.br
Expert in chemical valorization of lignocellulosic materials and in
the thermo-chemical valorization of forest and agro-industrial residues.

FRANCISCO VILAPLANA Ph.D.
researcher, School of Biotechnology, KTH
franvila@kth.se
Expert in chemical valorization of lignocellulosic materials. Expert in
chemistry of lignocellulose.

FRANCK DUMEIGNIL Ph.D.
professor, Lille University, France
franck.dumeignil@univ-lille1.fr
Expert lignocellulosic biorefineries. Expert in catalytic valorization of
biomass.

Opposed Reviewers:

Dr. Patricia Thornley

Editor-in-chief of Biomass and Bioenergy

Madrid, 6th, June 201

Dear Dr. Thornley,

Attached to this letter you may find the files containing the manuscript entitled “Use of additives to improve the enzymatic hydrolysis of pre-treated wheat straw with an ethanol-water mixture” by Priscilla Vergara, Miguel Ladero, José M. Carbajo, Félix García-Ochoa and Juan C. Villar, that we wish to publish in Biomass and Bioenergy journal.

This manuscript is a study of the effect of several additives, as non-ionic surfactants and proteins, on the enzymatic hydrolysis of ethanol-water pre-treated wheat straw. The enzymatic saccharification has been made with two pre-treated materials, one with high delignification and another with low delignification, to study the effect of the residual lignin. Three concentrations of each additive have been tested for each substrate.

As corresponding author, I have received the concurrence from all the authors for submit this manuscript to Biomass and Bioenergy. This manuscript has not been published previously and it is not under consideration for publication elsewhere.

Hoping the contents of this paper fulfil the standards of Biomass and Bioenergy, I remain sincerely yours,



J. Carlos Villar

HIGHLIGHTS

- Non-ionic surfactants and proteins were added to improve hydrolysis of wheat straw
- Casein, a cheap non-tested protein, was the most effective for any substrate
- Most additives present a positive behavior when added at low concentrations
- The hydrolysis improvement is more outstanding in low delignified substrates

Use of additives to improve the enzymatic hydrolysis of pre-treated wheat straw with an ethanol-water mixture

Priscilla Vergara^{a,b}, Miguel Ladero^b, José M^a Carbajo^a, Félix Garcia-Ochoa^b Juan C. Villar^{*a}

^aCellulose and Paper Laboratories. INIA. Ctra. de La Coruña km 7.5, 28040 Madrid, Spain.

^bChemical Engineering and Materials Department. Faculty of Chemistry. Universidad Complutense. 28040 Madrid, Spain.

Corresponding author: villar@inia.es +34 913 476 761

ABSTRACT

Enzymatic hydrolysis of pre-treated wheat straw has been studied. Several additives have been considered as potential improvers of glucose yield in the enzymatic hydrolysis. The inhibition of cellulases by the lignin has been identified as a cause of the decrease of the effectiveness and rate of the enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. Non-ionic surfactants, such as Tween 80 (poly(oxyethylene)₂₀-sorbitan-monooleate) and polyethylene glycol-6000, and proteins, as bovine serum albumin, casein and skimmed milk powder, have been used to improve the sugars yield in the enzymatic hydrolysis stage. The enzymatic saccharification has been studied for two pre-treated wheat straw materials, one with high delignification and another with low delignification. Three concentrations of each additive have been considered. The results obtained point out that the lignin content of the pre-treated lignocellulosic biomass has a decisive influence in reaching a high yield in the enzymatic saccharification. The additives checked have a moderate effect on the glucose hydrolysis rate. The more favorable option combines high delignification with the use of a cheap protein as casein, reaching a glucose yield increase of 6 % when the best conditions are used.

KEYWORDS

Enzymatic hydrolysis, Wheat straw, Additives, Non-ionic surfactants, Proteins.

HIGHLIGHTS

- Non-ionic surfactants and proteins were added to improve hydrolysis of wheat straw
- Casein, a cheap non-tested protein, was the most effective for any substrate
- Most additives present a positive behavior when added at low concentrations
- The hydrolysis improvement is more outstanding in low delignified substrates